Dott. Oliviero Mario Olivo

Curriculum vitae e pubblicazioni scientifiche

Torino - Giugno 1932 - X

TORINO
TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
1932

Dott. Oliviero Mario Olivo

Curriculum vitae
e pubblicazioni scientifiche

Torino - Giugno 1932 - X

TORINO
TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
1932

INDICE

Dott. Oliviero Mario Olivo

Curriculum Vitae

Nacque a Trieste il 24 maggio 1896.

Conseguì la licenza liceale presso il Civico Ginnasio Superiore « Dante Alighieri » di Trieste nel 1915.

Si arruolò volontario nell'Esercito Italiano per la guerra italo-austriaca nell'arma combattente degli Alpini il 1° giugno 1915.

Prestò ininterrottamente servizio al fronte come soldato sino al 1° febbraio 1917; come aspirante sino al 17 maggio 1917 e come sottotenente di complemento sino al termine della guerra. Appartenne come soldato al Battaglione Volontari Alpini del Cadore, VII Reggimento Alpini; come ufficiale al Battaglione Fenestrelle, III Reggimento Alpini.

Prigioniero di guerra nella ritirata dell'ottobre-novembre (10 novembre 1917). Durante la prigionia riuscì a evadere dal campo di Nagy-Megyer (Ungheria) nel giugno 1918 e a portarsi in prossimità del confine austro-svizzero, presso Landek. Catturato nuovamente fu inviato al campo di punizione nella fortezza di Komarom.

Rientrato dalla prigionia il 7 novembre 1918.

Gli furono conferite la Croce al merito di Guerra, la Medaglia dei Volontari di guerra e la Medaglia d'argento al valor militare ed inoltre il diritto di fregiarsi del distintivo delle quattro campagne 1915 - 1918 e di un distintivo d'onore di ferita.

Il 21 giugno 1916 venne citato all'Ordine del Giorno dal Comando Settore Padola-Visdende tra gli ufficiali e militari di truppa « che maggiormente si distinsero per arditezza e coraggio » nella seguente azione:

« Il giorno 19 corrente, tre plotoni di Guardie di Finanza ed il reparto Volontari Alpini hanno eseguite due ardite ricognizioni rispettivamente su forcella Manzon e Costa Curiola producendo perdite al nemico, distruggendo parte del reticolato e fornendo utilissime notizie ». N. 14119 di Protocollo.

La motivazione della medaglia d'argento è la seguente:

« Offertosi spontaneamente quale vedetta avanzata in posizione esposta ed isolata dall'alba al tramonto, ferito alla spalla sinistra alle ore 15 e fatto segno a continuo fuoco di fucileria, tanto da averne giubba e scarpe forate da parecchi proiettili, rimase al suo posto fino alle ore 21, momento del cambio, ritirandosi calmo e sereno. — Monte Forame, 24 agosto 1916 ».

Fu congedato il 15 novembre 1919.

Fu iscritto d'ufficio al I Corso di Medicina e Chirurgia presso la R. Università di Torino nell'anno accademico 1915-16. Fu successivamente iscritto, sempre d'ufficio, perchè combattente, al II, III, IV Corso di Medicina e Chirurgia nella stessa Università per gli anni 1916-19.

Fu allievo interno nell'Istituto Anatomico di Torino negli anni 1919 - 1920 - 1921.

Conseguì il 23 luglio 1921 la laurea in Medicina e Chirurgia presso la R. Università di Torino, riportando punti 110 su 110 con dichiarazione di lode, con una tesi fatta nell'Istituto di Anatomia umana normale di quella Università.

Fu nominato Assistente di Anatomia umana normale nell'Università di Torino per l'anno 1921 - 22 e confermato in tale ufficio sino al 1925.

Fu nominato nel 1925, per concorso, Aiuto di Anatomia umana normale presso la stessa Università e confermato in tale ufficio sino ad oggi.

Coadiuvò il Direttore Prof. G. Levi nelle esercitazioni pratiche di Anatomia microscopica e di Istologia durante gli anni 1921 - 28 e 1929 - 32, nel dirigere le ricerche e le tesi di numerosi allievi e laureandi, molte delle quali furono pubblicate, e nell'organizzazione del Laboratorio per le ricerche di Citologia sperimentale (vedi attestato allegato).

Nel 1926 - 27 tenne per incarico il Corso di Biologia generale per gli studenti di Medicina e Chirurgia e di Medicina Veterinaria nell'Università di Torino. Tale incarico gli fu riconfermato per gli anni 1927 - 28, 1928 - 29, 1929 - 30, 1930 - 31, 1931 - 32.

Conseguì per titoli e per esame la libera docenza in Istologia e Biologia generale, con decreto in data 27 gennaio 1928.

Negli anni 1929 - 30, 1930 - 31, 1931 - 32 tenne un Corso libero di Tecnica istologica ed Embriologia nella R. Università di Torino.

Fu professore incaricato di Anatomia nel R. Istituto di Magistero per l'Educazione fisica per l'anno 1922 - 23 e per il Corso accelerato ottobre-dicembre 1923. Cessò da tale incarico per soppressione della Scuola.

Nell'inverno del 1924 lavorò nei laboratori della ditta Zeiss, diretti dal Prof. Siedentopf, dove eseguì cinematografie di colture in vitro. Contemporaneamente fu ospite del Prof. T. Péterfi, dal quale apprese la tecnica della microdissezione.

Nello stesso anno fu inviato per conto dell'Istituto Anatomico di Torino a Copenaghen presso il Dott. A. Fischer, dal quale apprese i dettagli tecnici più recenti riguardanti la coltivazione dei tessuti secondo il metodo di Carrel.

Nel 1926 ottenne dalla « Rockefeller Institution » una borsa di studio per l'estero.

Dall'ottobre 1926 al febbraio 1927 lavorò nell'Istituto Anatomico di Würzburg, diretto dal Prof. H. Petersen, dove si occupò di Morfologia causale. Interruppe il lavoro in tale Laboratorio essendogli stato conferito l'incarico del Corso di Biologia generale presso la R. Università di Torino.

Fu nominato, in seguito a proposta del Dott. A. Carrel, Assistente presso il « Rockefeller Institut for Medical Research » di New-York per l'anno 1928 - 29, dove lavorò nella sezione di Chirurgia sperimentale diretta da A. Carrel.

Il Dott. Alexis Carrel in una lettera privata diretta al Prof. G. Levi, in data 17 maggio 1932, ha espresso il seguente giudizio sulle attitudini del Dott. Olivo all'indagine scientifica:

« Mon cher et éminent Collègue,

« Au cours de l'année qu'il a passé au Rockefeller Institute, j'ai eu le temps d'apprécier ses grandes qualités ».

« L'oeuvre scientifique d'Olivo est connue. Il est donc inutile de l'analyser. Mais je désire parler de l'esprit dans lequel cette oeuvre a été accomplie, et de ce qu'elle promet pour l'avenir. Olivo aime la science pour la science. Il vit pour elle. Il connait parfaitement son sujet. Il est ingenieux, enthousiaste, et patient. Il se développera indéfiniment. Outre les qualités qui lui son propres, il possède, par les avoir reçues de son maître de Turin, les habitudes d'esprit et la méthode rigoureuse que le monde scientifique d'Europe et d'Amérique admire chez ce dernier ».

Elenco delle Pubblicazioni Scientifiche

1. — (1922) — L'azione di elettroliti sui tessuti viventi, separati dall'organismo, studiata col metodo delle colture « in vitro ». — I. - Conseguenze dell'azione temporanea e permanente degli elettroliti NaCl, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KJ, LiCl sui frammenti di tessuti di embrioni di pollo isolati e coltivati « in vitro ». (*Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei,* vol. *31,* 163).

2. — (1922) — Id. — II. - Conseguenze dell'azione temporanea del cianuro di potassio su frammenti di tessuti di embrioni di pollo isolati e coltivati « in vitro » (*Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei,* vol. *31,* 200).

3. — (1922) — Id. — III. - Conseguenze dell'azione del cianuro di potassio su colture « in vitro » già sviluppate (*Rendic. R. Accad. Nazionale dei Lincei,* vol. *31,* 460).

4. — (1923) — Sulla dissociazione dell'attività contrattile del cuore di embrioni di pollo provocata dall'azione di sali di calcio e di potassio (*Giorn. d. R. Accad. di Med. di Torino,* A. *86°*, 179).

5. — (1923) — L'esistenza di miofibrille nel cuore di embrione di pollo vivente (*Giorn. d. R. Accad. di Med. di Torino,* A. *86°*, 277).

6. — (1924) — Sulle modificazioni dell'attività contrattile del cuore di embrioni di pollo determinate dall'azione di sali di calcio e di potassio (*Arch. di Fis.,* vol. *22,* 1).

7. — (1924) — Sull'inizio della capacità funzionale dei tessuti contrattili nell'embrione di pollo, in relazione alla loro differenziazione strutturale e morfologica. — I. - Differenziazione funzionale e morfologica dell'abbozzo cardiaco (*Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei,* vol. *33,* 209).

8. — (1924) — Id. — II. - Differenziazione funzionale e morfologica dei miotomi (*Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei,* vol. *33,* 297).

9. — (1924) — Differenziazione morfologica e funzionale dei miotomi e del cuore nell'embrione di pollo (*Giorn. d. R. Accad. di Med. di Torino,* A. *87°*, 117).

10. — (1925) — Sull'inizio della funzione contrattile del cuore e dei miotomi dell'embrione di pollo in rapporto alla loro differenziazione morfologica e strutturale (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *1,* 427).

11. — (1925) — Sull'istituirsi della sincronicità tra le pulsazioni di frammenti di cuore embrionale di pollo e di colombo, coltivati insieme « in vitro » (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *2,* 191).

12. — (1925) — Sui caratteri morfologici di un ceppo di elementi del miocardio di pulcino, coltivati in vitro per cinque mesi (*Giorn. d. R. Accad. di Med. di Torino*, vol. *88*, 120).

13. — (1925) — Sui caratteri morfologici di un ceppo di elementi del miocardio embrionale di pollo, coltivati « in vitro » per sei mesi (*Mon. Zool. Ital.*, A. *36*, 171).

14. — (1925) — Sulle modificazioni delle cellule coltivate « in vitro » nelle varie fasi della loro vita (*C. R. de l'Ass. des Anat.*, XX Riun. in Torino, 6-8 apr. 1925).

15. — (1925) — Ricerche di microdissezione su cellule somátiche coltivate « in vitro » (in collaborazione con T. Péterfi) (*C. R. de l'Ass. des Anat.*, XX Riun. in Torino, 6-8 aprile 1925).

16. — (1926) — Di alcuni caratteri fisici e chimici del corpo glicogenico del midollo lombo-sacrale degli uccelli (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 81).

17. — (1926) — Modificazioni di forma e di grandezza delle cellule piramidali della circonvoluzione centrale anteriore umana durante l'accrescimento somatico (in collaboraz. con lo stud. G. Gagliano) (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 111. - *Atti VII Congr. della Soc. It. di Neurol. Torino*, 7-9 aprile 1926, pubbl. 1929).

18. — (1926) — Sulla migrazione di neuroblasti coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 90).

19. — (1926) — Comportamento del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per più settimane « in vitro » (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 509).

20. — (1926) — Modificazioni dei caratteri citologici del citoplasma di cellule coltivate « in vitro » provocate dalla varia composizione del mezzo nutritivo (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 523).

21. — (1926) — Sulla ripresa dell'attività ritmica contrattile spontanea di frammenti di cuore di pulcino coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. di Biol. Sper.*, vol. *1*, 516).

22. — (1926) — Sui fattori della sdifferenziazione strutturale e funzionale degli elementi miocardici di pollo coltivati « in vitro » (*Mon. Zool. It.*, A. *37*, 69).

23. — (1926) — Les caractères cytologiques des myoblastes d'embryon de poulet cultivés « in vitro » pendant quatorze mois (*C. R. de l'Assoc. des Anat.*, XXI Riun. in Liegi, 29-31 marzo 1926).

24. — (1927) — Migrazione di elementi nervosi coltivati « in vitro » (*Arch. f. exper Zellf.*, vol. *4*, 43).

25. — (1927) — Differenziazione e sdifferenziazione del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per più settimane « in vitro » (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *5*, 46).

26. — (1927) — Risultati dell'innesto nell'allantoide (metodo Murphy-Rous) dei tessuti coltivati « in vitro » (in collaborazione con F. Corinaldesi) (*Boll. Soc. It. di Biol. Sper.*, vol. *2*, 717).

27. — (1927) — Die Wirkung des Anstechens auf das Protoplasma lebender Zellen. — I. - Anstichversuche an in vitro gezüchteten Myoblasten (in collaborazione con T. PÉTERFI) (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *4*, 149).

28. — (1928) — Differenziazione istologica ottenuta « in vitro » del cuore di pollo indifferenziato (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 9).

29. — (1928) — Sulla precoce determinazione del materiale destinato a formare il cuore dell'embrione (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 18).

30. — (1928) — Le proprietà strutturali delle cellule e dei tessuti coltivati « in vitro » (in collaborazione con G. LEVI) (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *6*, 46. - Relaz. al X Congr. Int. di Zool., Sez. Citologia Sperim., in Budapest, 3 - 12 settembre 1927).

31. — (1928) — Sulla durata dell'intercinesi nelle cellule coltivate in vitro (in collaborazione con lo stud. E. DE LORENZI) (*Rendic. R. Acc. Naz. dei Lincei*, vol. *7*, 936).

32. — (1928) — Frequenza delle mitosi nel cuore embrionale di pollo a vari stadi di sviluppo e nelle colture « in vitro » dello stesso materiale (in collaborazione con lo stud. E. SLAVICH) (*Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei*, vol. *7*, 1061).

33. — (1928) — Ueber die frühzeitige Determinierung der Herzanlage beim Hühnerembryo und deren histologische und physiologische Differenzierung « in vitro » (*Anat.*, Anz. *66*, 108 - *Verh. Anat. Ges.*, 37ª Riun. in Francoforte s. M., 15 - 18 aprile 1928).

34. — (1928) — Précoce détermination de l'ébauche du coeur dans l'embryon de poulet et sa differenciation histologique et physiologique « in vitro » (*C. R. Ass. des Anat.* - XXIII Riun. in Praga, 2-4 aprile 1928).

35. — (1928) — Rigenerazione di organi sensitivi in « Amiurus nebulosus » (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 1019).

36. — (1928) — Effetto delle ferite sulla rigenerazione delle cellule sensoriali negli organi della linea laterale di Axolotl (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 1027).

37. — (1928) — Differenziazione di miofibrille nell'abbozzo cardiaco dell'embrione di pollo coltivato « in vitro » indipendentemente dall'attività funzionale (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 1041).

38. — (1928) — Recenti contributi allo studio della morfologia e biologia dei tessuti coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *3*, 1229 - Relazione all'Assemblea gen. in Torino, sett. 1928).

39. — (1929) — Sulle modificazioni strutturali e funzionali del miocardio di pollo coltivato « in vitro » (*Arch. f. exper., Zellf.*, vol. *8*, 250).

39 bis — (1929-30) — Lezioni di Biologia generale, con 257 fig. nel testo, 787 pag. (*Ed. litografica Felice Gilli, Torino*).

40. — (1930) — Ricerche sulla velocità dell'accrescimento delle cellule e degli organi. — I. - Accrescimento ponderale, coefficiente mitotico dell'accrescimento e durata della mitosi e dell'intercinesi nel cuore embrionale di pollo (in collaborazione con lo stud. E. Slavich) (*Wilh. Roux' Arch. f. Entw.mech. d. Org.*, vol. *121*, 96).

41. — (1930) — Id. — II. - Coefficiente mitotico dell'accrescimento degli espianti di cuore di pollo coltivati «in vitro» (in collaborazione con lo stud. E. Slavich) (*Wilh. Roux' Arch. f. Entw.mech. d. Org.*, vol. *121*, 408).

42. — (1930) — Differenziazione morfologica e funzionale del tessuto miocardico coltivato « in vitro » e conservazione prolungata delle sue proprietà specifiche (*Mon. Zool. Ital.*, suppl. al vol. *40*, 319. - *Atti Soc. It. Anat.*, I Convegno, Bologna, 8-10 ottobre 1929).

43. — (1930) — Capacità di accrescimento illimitato di colture di poche cellule (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *5*, 101).

44. — (1930) — Differenziazione « in vitro » di fibre collagene (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *5*, 109).

45. — (1930) — Sulla velocità di accrescimento « in vitro » di elementi mesenchimali isolati da organi differenti (in collaborazione con E. Porta) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *5*, 330).

46. — (1930) — Accrescimento ponderale e coefficiente mitotico dell'accrescimento nel cuore embrionale di pollo incubato a temperatura inferiore alla normale (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *5*, 882).

47. — (1930) — Experiments on the differentiation and growth of the cardiac tissue in chicken embryos (*4th World's Poultry Congress*, Londra, 22 - 30 luglio 1930).

48. — (1931) — Durata delle mitosi nelle cellule embrionali del cuore e del fegato di pollo (in collaborazione con E. Porta) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *6*, 71).

49. — (1931) — Differenze nell'accrescimento ponderale, coefficiente mitotico dell'accrescimento e durata della mitosi tra fegato e cuore embrionale (in collaborazione con E. Porta) (*Mon. Zool. Ital.*, Suppl. al vol. *41*, 213 - *Atti Soc. It. Anat.*, II Conv., Firenze, 4-7 ott. 1930).

50. — (1931) — Accrescimento ponderale e coefficiente mitotico dell'accrescimento del cuore di embrioni di pollo incubati a temperature differenti (*Mon. Zool. Ital.*, Suppl. al vol. *41*, 206. - *Atti Soc. It. Anat.*, II Conv., Firenze, 4 - 7 ottobre 1930).

51. — (1931) — Das qualitative und quantitative Wachstum der Gewebe « in vitro » und dessen Faktoren (*Arch. f. exper. Zellf.*, vol. *11*, 272. - *Relaz. al II Congresso Int. di Citologia*, Amsterdam, 4-9 agosto 1930).

52. — (1931) — Migrazione e mitosi nelle colture « in vitro » (in collaborazione con lo stud. E. De Lorenzi) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *6*, 811).

53. — (1931) — Coefficiente mitotico di espianti coltivati « in vitro » in rapporto a differenti terreni nutritivi (in collaborazione con lo stud. G. GOMIRATO) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *6*, 821).

54. — (1931) — Azione inibitrice dell'accrescimento delle colture « in vitro » da parte del coagulo di plasma invecchiato (*Mon. Zool. It.*, Suppl. al vol. *42*. - *Atti Soc. It. Anat.*, III Conv., Palermo, ottobre 1931).

55. — (1932) — Birefrangenza e miofibrille nei mioblasti del pollo (*Boll. Soc. It. Biol. Sper*, vol. *7*, 1932).

56. — (1932) — Coefficiente mitotico dell'accrescimento delle colture « in vitro » in plasma ipotonico (in collaborazione con lo stud. G. GOMIRATO) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. *7*, 1932).

57. — (1932) — Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. — III. - Coefficiente mitotico dell'accrescimento, distribuzione topografica e cronologica delle mitosi e durata dell'intercinesi nella zona di migrazione delle colture « in vitro » ricavata coll'osservazione diretta (in collaborazione con lo stud. E. DE LORENZI) (*Arch. f. exp. Zellf.*, vol. *13*).

58. — (1932) — Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. — IV. - Grandezza delle cellule dei gangli spinali del pollo (in collaborazione con E. PORTA e L. BARBERIS) (*Arch. It. Anat. e Embr.*, vol. *29*).

59. — (1932) — Rigenerazione sperimentale degli organi della linea laterale di Axolotl e azione sugli stessi organi di ferite cutanee fatte in loro prossimità (*Arch. di Scienze Med.*, vol. *56*).

60. — (1932) — Nozioni elementari sull'eredità (*Ed. Minerva Medica, Torino*).

61. — (1932) — Potenzialità di accrescimento di poche cellule somatiche isolate (*Mon. Zool. It.*, vol. *43*).

I. — Citologia generale descrittiva e sperimentale

1. — L'azione degli elettroliti sui tessuti viventi separati dall'organismo, studiata col metodo delle colture « in vitro ». — I. - Conseguenze dell'azione temporanea e permanente degli elettroliti NaCl, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KJ, LiCl sui frammenti di tessuti di embrioni di pollo isolati e coltivati « in vitro » (*Rendic. R. Acc. Naz. Lincei, 31*, 163, 1922).

2. — Id. — II. - Conseguenze dell'azione temporanea del cianuro di potassio su frammenti di tessuti di embrioni di pollo isolati e coltivati « in vitro » (*Rendic. R. Acc. Naz. Lincei, 31*, 200, 1922).

3. — Id. — III. - Conseguenze dell'azione del cianuro di potassio su colture « in vitro » già sviluppate (*Rendic. R. Acc. Naz. Lincei, 31*, 460, 1922).

Scopo di queste ricerche fu di stabilire quali modificazioni possano assere apportate alle attività biologiche di cellule di tessuti viventi, separate dall'organismo, dal trattamento temporaneo con soluzioni sia di elettroliti che anche normalmente concorrono a costituire i liquidi organici, ma in concentrazioni diverse dalle usuali, sia di elettroliti estranei alla costituzione dei liquidi organici.

L'importanza che hanno i vari elettroliti nella composizione dei liquidi di perfusione impiegati per lo studio di attività biologiche complesse, come la contrazione muscolare, la secrezione, la conducibilità nervosa, ecc. negli organi allo stato di sopravvivenza, e i concetti di J. Loeb sulla velenosità degli ioni-Na, -K, -Ca e sulla loro azione antagonista diedero lo spunto a queste ricerche.

Fu impiegato il metodo delle colture « in vitro » secondo la tecnica di Harrison-Burrows in goccia pendente di plasma, perchè particolarmente adeguato a poter stabilire con sicurezza se gli elementi di un tessuto sono ancora vivi ed integri e a poter seguire

al microscopio le più intime e minute alterazioni, che possono avvenire nella struttura e nelle attività elementari delle cellule.

L'A. potè dimostrare che vari tessuti di embrioni di pollo (cuore e pelle) dall'8° al 14° giorno di incubazione, isolati, anche se trattati per varie ore (4 - 5) con soluzioni pure al 0,9 % di solo NaCl, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KJ, LiCl conservano inalterata la capacità di dare le usuali manifestazioni vitali dei tessuti coltivati « in vitro », cioè ricca migrazione di cellule nel coagulo di plasma e moltiplicazione per mitosi delle medesime.

Questi esperimenti dimostrarono che l'azione tossica temporanea degli elettroliti non cagiona lesioni irreparabili nelle cellule isolate, ma tutt'al più reazioni chimiche reversibili.

Gli elementi degli stessi tessuti conservano pure integra la capacità a migrare e a moltiplicarsi e non presentano alterazioni citologiche rilevabili, anche se fatte sviluppare in un mezzo di coltura, che contiene in permanenza un eccesso di NaCl, KCl, $CaCl_2$, KJ, LiCl sino ad una concentrazione del 0,25 %, mentre le stesse manifestazioni risultano soltanto attenuate, ma non incompatibili con una percentuale del 0,45 % degli stessi sali nel mezzo di coltura.

La tolleranza all'azione dei singoli elettroliti risultò perciò molto maggiore per le attività fondamentali proprie alle cellule isolate che per attività più complesse di organi interi.

Per l'azione del KCN, che è considerato uno dei più potenti veleni delle ossidazioni e delle funzioni catalitiche dei fermenti di origine animale e vegetale, l'A. dimostrò per piccoli frammenti di tessuti embrionali di pollo una resistenza molto superiore a quella degli animali interi. I frammenti sopravvivono per 8 minuti ad una concentrazione 1 : 20 Norm. e per alcune ore ad una concentrazione 1 : 500 Norm. In accordo con le osservazioni di Child in Planaria, constatò una resistenza tanto maggiore, quanto più giovane è l'embrione da cui si preleva il tessuto. Le cellule migrate nel plasma tollerano soluzioni di KCN a una concentrazione minore e per un periodo di tempo più breve dei tessuti da cui le cellule provengono. Le soluzioni diluite $^{n}/_{500}$, $^{n}/_{100}$ fatte agire per pochi minuti determinano in un primo tempo una maggiore vivacità dei movimenti ameboidi, e in secondo tempo un'alterazione caratteristica dei nuclei; questi si fanno dapprima finemente granulosi, la loro membrana diventa più refrangente, il nucleolo si dissolve ed infine i nuclei si fanno picnotici per l'emissione di uno

o più grossi vacuoli chiari. A queste alterazioni dei nuclei segue la citolisi di tutta la cellula.

Bisceglie e Bucciardi (1) confermano che l'azione temporanea del cloruro di potassio sugli espianti non determina alterazioni citologiche degne di nota. Demuth (2) in ricerche eseguite con lo stesso indirizzo di Olivo, ne conferma i risultati circa l'azione del cloruro di calcio, in più studia l'effetto di questo sulla grandezza cellulare e sul rapporto N/P. Péterfi e Naville (3) confermano i risultati di Olivo sull'azione del cianuro di potassio sul protoplasma: « Nur eine chemische Substanz ruft fast die gleichen Erscheinungen hervor wie der Kernstich, nämlich die in die Zelle injizierte Cyankaliumlösung oder der Cyanwasserstoff. Wie dies zuerst von O. Olivo gezeigt und später von Péterfi an verschiedenen Zellen immer wieder gefunden wurde, genügen schon minimalen Mengen einer Cyanwasserstofflösung um die sofortige Entmischung des Protoplasmas, die Verflüssigung und den Tod der Zelle herbeizuführen ».

Gli effetti ottenuti da Olivo sulle cellule coltivate « in vitro » per azione del cianuro di potassio vengono ricordati dettagliatamente da W. H. e M. R. Lewis nella « General Cytology », edita da V. Cowdry (1924), a pag. 409. Su queste ricerche riferiscono a lungo Bisceglie e Juhasz-Schaeffer (4), Krontowski (5) e G. Levi (6).

Ricerche fatte con lo stesso indirizzo, contemporanee e successive a quelle di Olivo, sono quelle di Wilson (7), che dimostrano la tolleranza delle colture al solfato di rame e all'arsenito sodico; di Bauer, che dimostra l'arresto dell'accrescimento nelle colture trattate con acido pirogallico (8) e con anidride carbonica (9) e la successiva ripresa della migrazione nelle colture, dopo riportate in mezzo normale; di Fischer-Piette (10), che dimostra gli stessi fatti con sistema ossido-riduttivo; di Jazimirska-Krontowska (11), che studia l'azione del K e del Ca sull'accrescimento.

(1) Bisceglie e Bucciardi: Le modificazioni funzionali e strutturali degli espianti di cuore embrionale di pollo sottoposto all'azione di sostanze radioattive (« Arch. f. exp. Zellf. », 7, 1928).

(2) Demuth F.: Einwirkung chemischer Stoffe auf Zellen in Gewebekulturen (« Verh. der d. Path. Ges », 26, 1931).

(3) Péterfi T. und Naville A.: Die Wirkung des Kernstiches auf das Protoplasma der Amoeba sphaeronucleus (« Protoplasma », 12, 1931).

(4) Bisceglie e Juhasz-Schaeffer: Die Gewebezüchtung « in vitro » (Verl. J. Springer, 1928).

(5) Krontowski A.: Explantation und deren Ergebnisse (« Erg. der Physiologie », 26, 1928).

(6) Levi G.: Culture di tessuti (« Mon. Zool. It., », 34, 1923).

(7) Wilson L. Y.: Tolerance and acquired tolerance of the mesenchime in tissue cultures for the copper sulphate and sodium arsenite (« The John Hopkins Hosp. Bull. », 33, 1922).

(8) Bauer T.: The effect of pyrogallic acid upon connective-tissue cells of the chick embryo in tissue cultures (« The John Hopkins Hosp. Bull. », 34, 1923).

(9) Id.: The effect of carbon-dioxide on cells in tissue cultures (« Id. », 37, 1925).

(10) Fischer-Piette E.: Ralentissement et arrêt expérimental de la croissance des cultures de tissus (« C. R. Soc. de Biol. », 102, 1929).

(11) Jazimirska-Krontowska: Influence du potassium et du calcium sur la croissance et le métabolisme des tissus «in vitro» (« C. R. Soc. de Biol. », 103, 1930).

4. — Sulla dissociazione dell'attività contrattile del cuore di embrioni di pollo provocata dall'azione di sali di calcio e di potassio (*Giorn. R. Acc. Med. di Torino*, A. *86°*, 179, 1923).
6. — Sulle modificazioni dell'attività contrattile del cuore di embrioni di pollo determinate dall'azione di sali di calcio e di potassio (*Arch. di Fisiol.*, *22*, 1, 1924).

Durante lo studio dell'azione dei vari elettroliti sui tessuti coltivati « in vitro », l'A. si accorse di una particolare turba della attività contrattile indotta dal cloruro di Ca e di K.

Alte dosi di questi sali fatte agire su frammenti di cuore embrionale di pollo coltivati in plasma arrestano le contrazioni sinergiche ritmiche regolari che interessano abitualmente tutta la massa del frammento coltivato, come durante l'attività funzionale normale del cuore integro, e determinano diffusamente in tutto il tessuto contrazioni rapide asincrone di porzioni piccolissime di esso, determinano cioè una attività contrattile fibrillare microscopica.

In questi lavori l'A. si occupa molto dettagliatamente del fenomeno constatato, determinando la dose di CaCl e di KCl necessarie a ottener la fibrillazione in funzione del grado di differenziazione istologica raggiunto dal tessuto; studia l'azione antagonista del $CaCl_2$ e del KCl e dimostra che il potassio usato in dose appropriata, dopo o contemporaneamente all'azione del calcio, sospende nei frammenti qualsiasi forma di attività contrattile, manifestando azione antagonista al calcio; se usato in dose molto alta e superiore a quella del calcio ha sempre azione di arresto sulle contrazioni sinergiche, ma fa insorgere le contrazioni microscopiche dissociate come quando agisce da solo.

Dimostra ancora la reversibilità delle modificazioni funzionali indotte da questi sali.

L'A. stabilisce, per quanto gli è consentito, quale rapporto vi sia tra la fibrillazione microscopica da lui constatata in coltura

e la fibrillazione cardiaca descritta dai fisiologi e dai patologi per il cuore intero.

Uno dei risultati più importanti di questa ricerca, che deriva dallo studio simultaneo che è stato fatto delle modificazioni funzionali indotte dagli elettroliti negli espianti di cuore e dei loro caratteri istologici, è la dimostrazione indiretta della reale esistenza delle miofibrille.

Le contrazioni dissociate minute non si possono determinare negli embrioni precoci (10 - 11 somiti) in cui da poco si iniziò la attività contrattile e nei quali le miofibrille non si sono ancora differenziate o sono scarsissime, e nei frammenti di cuore più inoltrati nello sviluppo, coltivati così a lungo « in vitro » che siano scomparse le miofibrille. Quindi le contrazioni dissociate microscopiche osservate per azione del calcio sarebbero dovute all'attività delle miofibrille.

Dopo un periodo di tempo variabile, la capacità di compiere contrazioni sinergiche e quella di compiere contrazioni dissociate si possono esaurire nei frammenti di cuore, in modo definitivo, indipendentemente l'una dall'altra. Di questo fatto e della diversa sensibilità delle due forme di attività cardiaca agli agenti chimici e fisici, ci si può render conto ammettendo nella fibra muscolare cardiaca un dualismo funzionale secondo l'ipotesi di Bottazzi.

Queste ricerche sono state ricordate da Krontowski (già citato a pag. 13) nel capitolo della fisiologia normale e patologica del cuore.

5. — L'esistenza di miofibrille nel cuore di embrione di pollo vivente (con 4 figure) (*Giorn. R. Acc. Med. di Torino, 86*, 277, 1923).

55. — Birefrangenza e miofibrille nei mioblasti del pollo (*Boll. Soc. It. Biol. Sperim., 7*, 1932).

Per le miofibrille dell'elemento contrattile, come per molte altre strutture istologiche, è stato spesso sollevato il dubbio che non si tratti di reali entità morfologiche, ma di artefatti dovuti ai metodi di fissazione e colorazione.

Specialmente W. Lewis sostenne quest'ultimo punto di vista per le fibre dei muscoli scheletrici e per il miocardio di embrioni di pollo ed espresse il convincimento che le miofibrille sono degli artefatti e che di preesistente non vi sarebbe che una striatura trasversale alla superficie del mioblasta.

G. Levi ha portato invece dei validi argomenti che provano la reale esistenza delle miofibrille nel cuore e nei muscoli dell'embrione vivente e nei mioblasti delle colture.

Olivo riporta nella prima di queste note i dati di alcune osservazioni dirette fatte su colture di mioblasti viventi in cui ha potuto obbiettivamente constatare la reale esistenza delle miofibrille trasversalmente striate e la loro graduale sdifferenziazione in miofibrille liscie prima e scomparsa totale poi, confermando così i reperti di G. Levi.

Nella seconda di queste note l'A. porta una nuova conferma morfologica obbiettiva della reale esistenza delle miofibrille. Dimostra che alla loro prima comparsa le miofibrille sono liscie e uniformemente birefrangenti, successivamente compare la striatura trasversale. Stabilisce pure i rapporti esistenti tra la comparsa di questi dati morfologici durante l'istogenesi degli elementi contrattili e l'istituirsi della contrattilità e viene alla conclusione che:

1) la birefrangenza precede di poco o coincide con l'istituirsi della contrattilità;

2) la birefrangenza è a carico delle miofibrille, e tale proprietà ottica permette di rilevarne in alcuni casi l'esistenza prima dell'ordinaria tecnica istologica, almeno per i mioblasti dei miotomi;

3) anche nel vivente si può constatare con la luce polarizzata più facilmente che a luce ordinaria la reale esistenza delle miofibrille;

4) la contrattilità dei mioblasti non è legata all'esistenza della striatura trasversale.

G. Levi ha riaffermato più volte le sue prime osservazioni della reale esistenza delle miofibrille nelle fibre viventi. Ricorda più volte nei suoi scritti le osservazioni di Olivo.

Friedheim (1) ha confermato recentemente le vedute di M. e W. Lewis, che le miofibrille sono un artefatto dovuto alla fissazione, e che il reale sustrato della contrazione sia submicroscopico, forse dell'ordine di grandezza molecolare. Di più afferma che in luce polarizzata monocromatica, a Nicol incrociati, le fibre contrattili che a luce ordinaria appaiono omogenee, presentano una striatura trasversale periodica chiara e oscura; questa striatura trasversale scompare completamente o quasi dopo fissazione e compare invece la striatura longitudinale. Questo risultato è stato ottenuto con muscoli volontari di embrioni di 8 - 11 giorni di incubazione, coltivati per 3 - 6 giorni in vitro. In questo stadio le fibre sono già notevolmente mature e stupisce che l'Autore non abbia osservato nel

vivente le miofibrille, tanto più che nella sua fig. 5 della tav. 5 di una fibra vivente esaminata in luce polarizzata, la striatura longitudinale dovuta alle miofibrille è più netta di quella trasversale dovuta alla struttura periodica mono- e birefrangente di tutta la fibra. Quindi non sembra giustificata l'affermazione di quest'A. che le miofibrille sieno un artefatto dovuto alla fissazione.

Per i rapporti tra struttura microscopica e contrattilità l'A. dice: « Ob Doppelbrechung oder Myofibrillen für die Kontraktilität wesentlicher sind, erscheint zunächst unwichtig für die hier interessierende Hauptfrage: Besteht eine Beziehung zwischen der polaren Funktion der Kontraktilität und einer polaren Struktur des Protoplasma, oder ist das Substrat de Funktion submikroskopisch im optisch leerem Protoplasma verborgen, unfassbar für die morphologische Forschung? Bei solcher Betrachtung ist es zunächst gleichgültig, ob eine Struktur in der lebenden Faser durch Unterschiede der optischen Absoption un Refraktion zu erkennen ist oder im histologischen Präparat durch chemische oder phisikalisch-chemische Affinitäten. In diesem Sinne bedeutet auch in den schönen Untersuchungen von Olivo (si rif. al lav. 10) das « streifige Aussehen » (aspetto pettinato) der kontraktilen Myoblasten, in denen noch keine Fibrillen nachweisbar sind, einen positiven Befund von Struktur und Differenzierung, so dass diese Zellen nich als Kronzeugen für die Bottazzische Sarkoplasmatheorie einzusetzen sind ».

« Auf die gestellte Frage geben die mitgeteilten Befunde für das untersuchte Objekt eine eindeutige Antwort: Nur Fasern mit auf Doppelbrechung beruhender Quersteifung sind kontraktionsfähig ».

Ognuno che abbia esperienza della tecnica delle colture in vitro sa della difficoltà di dimostrare la contrattilità di singoli elementi, quando questi non sieno spontaneamente contrattili. E' possibile che Friedheim non abbia constatato la contrattilità di fibre sprovviste di striatura trasversale, perchè queste fibre conservano forse una capacità contrattile troppo debole. Sotto questo punto di vista è molto più adatto il materiale cardiaco scelto da Olivo.

In quanto ai rapporti tra contrattilità e miofibrille Olivo ha dimostrato (6, 10) tanto per i miotomi che per il cuore, che la prima può essere indipendente dalle seconde, e nelle ultime osservazioni (55) ha precisato anche che la contrattilità compare forse simultaneamente alla birefrangenza, ma non è subordinata a una distribuzione periodica trasversale della birefrangenza. Le miofibrille microscopiche possono essere precedute da strutture fibrillari ultramicroscopiche, anzi ciò è molto probabile, ma è d'altronde fuori di dubbio che a un certo momento dell'istogenesi delle fibre muscolari queste parti ultramicroscopiche si ingrandiscono o si riuniscono in aggregati di ordine di grandezza microscopica già nel vivente e non soltanto per effetto dei fissatori. In quanto alla distribuzione delle parti mono- e birefrangenti nei mioblasti coltivati

in vitro non sono chiariti ancora tutti i punti; alcune belle osservazioni dei Lewis dimostrano che la striatura trasversale può essere indipendente dalla presenza delle miofibrille. Su quest'argomento sono necessari ulteriori esperimenti. Recentemente se ne è occupato anche Goss (2), il quale conferma in colture di tessuto miocardico di ratto la reale esistenza delle miofibrille, che avrebbe visto differenziarsi nei mioblasti emigrati. Egli descrive pure un meccanismo particolare di origine della striatura trasversale nelle cellule migrate nel plasma, che interpreta come un fenomeno di ridifferenziazione istologica in vitro. Per accettare i reperti e l'interpretazione di Goss sulla striatura trasversale bisogna attendere ulteriori conferme e una documentazione più chiara.

(1) Friedheim E. A. H.: Morphologische und funktionelle Untersuchungen an isolierten in vitro gezüchtet en Skeletmuskelfasern (« Arch. f. Exp. Zellf. », 11,1931).

(2) Goss C. M.: The formation of cross-striations in cultures of embryonic heart muscle (« Arch. f. exp. Zellf. », 12, 1931 - 32).

12. — Sui caratteri morfologici di un ceppo di elementi del miocardio di pulcino, coltivati « in vitro » per cinque mesi (*Giorn. R. Acc. Med. di Torino, 88,* 120, 1925).
13. — Sui caratteri morfologici di un ceppo di elementi del miocardio embrionale di pollo, coltivato « in vitro » per sei mesi (con 2 tavole) (*Mon. Zool. It., 36,* 171, 1925).
14. — Sulle modificazioni delle cellule coltivate « in vitro » nelle varie fasi della loro vita (*C. R. Ass. des Anat., 20,* 1925).
20. — Modificazioni dei caratteri citologici del citoplasma di cellule coltivate « in vitro » provocate dalla varia composizione del mezzo nutritivo (*Boll. Soc. Biol. Sper., 1,* 1926).
23. — Les caractères cytologiques des myoblastes d'embryon de poulet cultivés « in vitro » pendant quatorze mois (con 9 figure) (*C. R. Ass. des Anat., 21,* 1926).

Questi lavori fanno parte di un vasto piano di ricerche sistematiche sulla morfologia dei tessuti coltivati « in vitro », che l'A. ha eseguito ininterrottamente per più di 10 anni.

Fino dai primi lavori l'A. ha sempre rilevato e dimostrato con le sue ricerche, che egli considera la coltivazione dei tessuti « in vitro » come un ottimo mezzo tecnico di ricerca, quanto mai adeguato allo studio di molti problemi generali di citologia, istogenesi, embriologia e mai come fine a sè stesso.

La citologia delle cellule coltivate « in vitro », specialmente per quanto si riferisce ai caratteri degli elementi che assumono forma

lamellare e migrano nel coagulo di plasma a formare la cosidetta zona d'invasione, era stata dettagliatamente descritta specialmente per opera di G. Levi e di M. R. Lewis e W. H. Lewis.

Olivo conferma molti dei dati descritti dagli AA. precedenti, ma non si limita soltanto allo studio delle cellule migrate; con lo studio delle sezioni microtomiche controlla anche quanto avviene negli espianti. Di più l'A. estende le nozioni già acquisite sulla morfologia delle cellule coltivate « in vitro », in quanto non si limita a studiare le cellule che si ottengono nei primi giorni di coltivazione di un espianto, ma continua lo studio attraverso trapianti successivi.

L'A. dà la seconda conferma (la prima era stata data da A. Fischer) dell'importante scoperta di A. Carrel della potenzialità di accrescimento illimitato, che hanno le cellule somatiche dei Metazoi quando siano isolate dall'organismo e tenute in un mezzo nutritivo adeguato.

In queste ricerche l'A. ha illustrato specialmente questi fatti:

1) L'attività migratoria delle singole cellule non è continua ed uniforme, ma si manifesta a periodi irregolari di migrazione rapida e periodi di relativa quiete (14).

2) Il condrioma va soggetto a variazioni reversibili sia quantitative che morfologiche anche in un mezzo ambiente costante (14).

3) Lo stesso si dica della parte anista del citoplasma, che presenta variazioni notevoli della sua viscosità e della intensità delle correnti citoplasmatiche interne (14).

4) La potenzialità di accrescimento illimitato delle cellule coltivate « in vitro » (12, 13).

5) La natura in prevalenza mioblastica delle cellule della zona di migrazione provenienti dagli espianti di cuore (12, 13).

6) L'importanza dell'ambiente nutritivo nel determinare modificazioni morfologiche reversibili nelle cellule (20). Per dimostrare quest'ultimo punto l'A. impiega come mezzo nutritivo estratto embrionale a varie concentrazioni. Trova che in seguito all'uso di estratto embrionale puro la parte anista del citoplasma si fa opaca, più intensamente colorabile che di norma dopo fissazione, il condrioma scompare o viene mascherato, e compaiono varie inclusioni citoplasmatiche intensamente colorabili, ecc. Queste modificazioni, che possono sembrare talora profonde alterazioni della cellula, non sono definitive; le stesse cellule trapiantate in plasma con succo

embrionale diluito o lavate in Ringer riprendono l'aspetto normale tipico.

Mossa (1) conferma per l'accrescimento dei neuriti quanto Olivo ha descritto per la migrazione delle cellule (1). A pag. 191 dice: « L'accrescimento dei neuriti non è continuo, ma esso si svolge con una caratteristica periodicità: stati di attivo accrescimento si alternano con periodi di arresto, raramente con periodi di rallentamento..... Olivo (1925) aveva potuto constatare una analoga periodicità per quello che riguarda le modificazioni della forma e della struttura dei mioblasti coltivati in vitro ».

Fazzari (2) ricorda diffusamente (pag. 373) gli esperimenti di Olivo che confermano la veduta secondo la quale gli elementi delle colture provenienti da tessuto miocardico embrionale giovane sono in prevalenza mioblasti sdifferenziati.

G. Levi nel capitolo « Gewebezüchtung », a pag 540 del trattato edito da T. Péterfi: « Methodik der wissenschaftlichen Biologie » (J. Springer, Berlino, 1928) scrive: « Das Herz des Huhnembryos vom 7. bis 17. Tage eignet sich sehr gut für die Anlage unbegrenzt wachsender Kulturen. Allerdings ist man sich noch nicht darüber einig, welche Zellarten nach mehreren Umbettungen in der Kultur vorherrschen. Carrel, Ebeling und A. Fischer nehmen an, dass die Muskelelemente sich nach mehreren Umbettungen rückbilden und dass die Fibroblasten des Bindegewebes die Oberhand gewinnen. Ich halte diese Annahme für unrichtig, da der Herzwentrikel des 7tägigen Embryos kein Mesenchym enthält. Olivo hat dies direkt bewiesen. Er hat Kulturen nach mehreren Umbettungen auf Serienschnitten untersucht und festgestellt, dass in denselben die Muskelzellen nicht rückgebildet sind und keine Vermehrung der Fibroblasten eingetreten ist. Der berühmte Stamm des Rockefeller-Instituts besteht demnach wahrscheinlich nicht aus Fibroblasten, wie Carrel meint, sondern aus entdifferenzierten Myoblasten ».

Bisceglie e Bucciardi (1928, già citati a pag. 13) accettano le conclusioni di Olivo: « Sulla base di queste ricerche si può quindi affermare che gli elementi che migrano da espianti di cuore embrionale di pollo sono dei mioblasti più o meno indifferenziati ».

Nel 1929 Olivo tornò ancora su quest'argomento (39, a pag. 287 e 288) e manifestò qualche prudente riserva sulla natura definitiva delle cellule del ceppo di Carrel. Queste riserve furono pienamente accettate da G. Levi (3), che a pag. 27 scrive: « Fondandomi sopra le mie ricerche e specialmente del mio collaboratore Olivo, ritenni che gli elementi delle colture a vita permanente (di cuore e per conseguenza anche quelle del ceppo di Carrel) siano elementi miocardici sdifferenziati. Però, pur essendo questa mia convinzione convalidata da validi argomenti, riconosco che le riserve espresse recentemente da Olivo, il quale ha molto approfondito questo argomento, sono giustificate; infatti dopo molti trapianti gli elementi miocardici perdono i propri attributi strutturali e non si

distinguono più dai fibroblasti, e basta, come rileva Olivo, che in un espianto esista un unico fibroblasta il quale abbia capacità di moltiplicarsi con maggiore frequenza dei mioblasti, perchè la percentuale dei primi divenga sempre maggiore, tendendo asintoticamente a diventare il 100 % ».

Bisceglie e Juhasz-Schaeffer (già citati a pag. 13) riferiscono ampiamente (pag. 60) le ricerche di Olivo sulle modificazioni citologiche reversibili indotte nelle cellule coltivate in vitro dalla varia composizione del mezzo ambiente. Queste ricerche furono eseguite e pubblicate da Olivo contemporaneamente ad eguali ricerche di Carrel ed Ebeling (4).

Levi e Bucciante (5) riferiscono estesamente i risultati di Olivo e quelli di Carrel ed Ebeling e rilevano che i dati non sono perfettamente concordanti. Olivo ha potuto stabilire, in base ad informazioni dirette avute da Carrel ed Ebeling, che la differenza nei risultati dipese dalla differente concentrazione del succo embrionale usato. Mentre Carrel ed Ebeling usarono quale succo nutritivo al massimo di concentrazione l'estratto embrionale diluito con due parti di Ringer, Olivo lo usò puro, così le due ricerche si completano a vicenda.

Queste ricerche di Olivo sono riportate anche nel trattato di E. Korschelt (6) nel capitolo Explantation.

Alcuni particolari concernenti l'architettura degli espianti coltivati da più tempo in vitro sono confermati da Bofill-Deulofeu (7).

L. Castaldi (8) riferisce la conferma e le considerazioni di Olivo sulla potenzialità di accrescimento illimitato delle cellule somatiche in coltura.

(1) Mossa S.: Ulteriori studi sulla velocità di accrescimento dei neuriti coltivati « in vitro » in funzione della temperatura ambiente (*Arch. f. exp. Zellf.*, 4, 1927).

(2) Fazzari I.: Sulla forma differente delle cellule mesenchimali dei vari organi coltivati « in vitro » (*Arch. f. exp. Zellf.* », 9, 1930).

(3) Levi G.: Organismo e tessuti (« Scientia », 1930).

(4) Carrel A. and Ebeling H.: The fundamental properties of the fibroblasts and the macrofage. I. The fibroblast. (« Journ. of exp. Med. », 44, 1926).

(5) Levi G. e Bucciante L.: Sulla natura delle colorazioni vitali studiate sulle cellule coltivate « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 7, 1928-29).

(6) Korschelt E.: Regeneration und Transplantation (II. Bd., Berlin, Borntrãger, 1931).

(7) Bofill-Deulofeu: Die argyrophile Faserskulturen in mesenchymale Gewebekulturen von verschiedener herkunfst und von verschiedener wachstumgeschwiedigkeit (« Zeitsch. f. Zellf. und mikr. Anat. », 14, 1931-32).

(8) Castaldi L.: Accrescimento corporeo e costituzione dell'uomo (Ed. L. Niccolai, Firenze, 1928).

10. — Sull'inizio della funzione contrattile del cuore e dei miotomi dell'embrione di pollo in rapporto alla loro differenziazione morfologica e strutturale (*Arch. f. exp. Zellf.*, *1*, 1925) (con 18 fig.).

15. — Ricerche di microdissezione su cellule somatiche coltivate « in vitro » (in collaborazione con T. Péterfi) (*C. R. Ass. des Anat.*, *20*, 1925).
27. — Die Wirkung des Anstechens auf das Protoplasma lebender Zellen. I. Anstichversuche an « in vitro » gezüchteten Myoblasten (in collaborazione con T. Péterfi) (*Arch. f. Exp. Zellf.*, *4*, 149, 1927) (con 1 tav.).

Scopo di queste ricerche fu di chiarire col metodo della microdissezione alcune particolarità dell'organizzazione delle cellule somatiche dei Metazoi e in particolare di studiare l'effetto di stimolazioni meccaniche sullo stato fisico-chimico del protoplasma.

Sono i primi tentativi di micrurgia fatti sulle cellule coltivate « in vitro ».

Si eseguirono lesioni molto limitate tanto di varie regioni del citoplasma che del nucleo. I risultati si possono riassumere così: l'azione meccanica degli strumenti sul citoplasma determina una trasformazione reversibile dei gel cellulari in sol (effetto tixotropico); l'intensità e l'estensione della trasformazione sono proporzionali all'intensità dell'azione meccanica. Non vi sono sotto questo aspetto parti del citoplasma più sensibili di altre. La puntura del nucleo invece dimostra che il contenuto nucleare è fluido. Le sostanze che immediatamente fuoriescono nel citoplasma (acido nucleinico?) fluidificano il citoplasma e determinano tali alterazioni irreversibili nella cellula che questa muore.

Ancora col metodo della microdissezione Olivo (10, pag. 451 e 452) dimostrò che soltanto raramente tra le cellule migranti nel plasma esistono reali anastomosi e che esse molto frequentemente sono soltanto apparenti.

Dimostrò inoltre che frammenti anucleati di cellula, staccati artificialmente dalla cellula cui appartengono, presentano per alcuni minuti movimenti ameboidi, ma ben presto interviene la fluidificazione del citoplasma e il frammento degenera; la cellula nucleata invece può subire perdite di parti anche considerevoli di citoplasma senza degenerare.

Queste ricerche furono confermate da ulteriori ricerche di Péterfi e collaboratori (1, 2, 3, 4, 5); da G. Levi (6); da Okkels (7); da Chambers e Fell (8). Questi ultimi AA. scrivono (pag. 397): « In agreement with previous work (Péterfi u. Olivo, 1925; Chambers u. Rényi, 1925) the nucleus was found to be very sensitive to injury, and in every case in wich the nucleus is even slightly punctured the cell sooner or later dies ». - (pag. 398) « In agreemen with previous work (Péterfi u. Olivo; Chambers) it was found that the cytoplasm is much less susceptible than

the nucleus to permanent injury ». - (pag. 399) « In confirmation of the observations of Olivo (1925) it was found that a comparatively large portion of the cytoplasm can be completely amputated without causing the death of the nucleated portion of the cell ».

Le ricerche di Olivo sono pure ricordate da Krontowski (già citato a pag. 13), da Harrison (9) e da Herzog (10). G. Levi nel Trattato di Istologia (U.T.E.T., 1926) riferisce ampiamente a pag. 56 e 74 sugli esperimenti di microdissezione di Olivo. Queste ricerche sono pure ricordate nel vol. « Wachstum und Vermehrung der lebendigen Masse » di F. Wassermann (« Handb. der Mikr. Anat. des Menschen »; h. von W. v. Möllendorf, vol. I, p. 11).

A. Fischer, nel manuale « Gewebezüchtung » (1930), ricorda: « Neuere mikrurgische Arbeiten von Péterfi und von Péterfi u. Olivo an gezüchteten Zellen gewähren uns interessante teils bestätigende, teils erweiternde Einblicke in das morphologische Verhalten der Zellen », e riferisce specialmente sul tixotropismo.

Sulla dottrina della costituzione sinciziale del connettivo non vi è ancora accordo. Anche recentemente Rubaschkin e Besuglaja (11) si sono mostrati favorevoli alla dottrina sinciziale basandosi su dati di osservazione istologica. Su quest'argomento sono necessarie ulteriori indagini; il fatto di poter dimostrare nelle colture « in vitro » la relativa rarità delle anastomosi non può aver importanza decisiva per il problema generale delle connessioni cellulari nel connettivo. L'esperimento « in vitro » dimostra che le cellule, anche quando nel vivente formano sincizi, conservano la capacità di individualizzarsi (Lewis, Levi) e di sopravvivere e moltiplicarsi anche isolate. Vedi anche il lavoro 43 a pag. 57.

(1) Péterfi T.: Anstiversuche an « in vitro » gezüchteten Vogelmonozyten (« Arch. f. exp. Zellf. », 4, 1927).

(2) Péterfi und Kapel: Anstiversuche an den Nervenzellen (« Id. », 5, 1928).

(3) Péterfi und Kapel: Die Pigmentzellen (« Id. », 5, 1928).

(4) Péterfi und Jamaka: Die Wirkung des mechanischen Drucks auf das Protoplasma der Nitella-Zelle (« Protoplasma », 12, 1931).

(5) Péterfi und Naville: Die Wirkung des Kernstiches auf das Protoplasma der Amoeba sphaeronucleus (« Protoplasma », 12, 1931).

(6) Levi G.: Ricerche sperimentali sopra elementi nervosi sviluppati « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 2, 1926).

(7) Okkels H.: Histochemische und mikrurgische Studien an Gewebekulturen von Lebergewebe (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

(8) Chambers R. and Fell H. B.: Microoperations an cells in tissue cultures (« Proc. Roy. Soc. London », 109, 1931).

(9) Harrison R. G.: On the status and significance of tissue cultures (« Arch. f. exp. Zellf. », 6, 1928).

(10) Herzog G.: Referat über die Bedeutung der Gewebezüchtung für die Pathologie (« Verh. d. Deutschen Path. Ges. », 1931).

(11) Rubaschkin W. u. Besuglaja W.: Symplasten, Syncyzien, Zellzn im Bindegewebe (« Zeitsch. f. Zellf. u. mikr. Anat. », 14, 1931 - 32).

16\. — Di alcuni caratteri fisici e chimici del corpo glicogenico del midollo lombo sacrale degli uccelli (*Boll. Soc. Biol. Sperim.*, *1*, 81, 1926).

E' un contributo alla conoscenza fisico-chimica degli elementi che costituiscono il cosidetto corpo glicogenico degli uccelli (Terni).

L'A. determina con metodo colorimetrico la percentuale di glicogene contenuta nelle cellule vescicolose che costituiscono il corpo glicogenico. Il glicogene arriva a rappresentare il 40 % del peso secco dell'organo. Col metodo della microdissezione dimostra che il glicogene si trova in queste cellule allo stato di soluzione fluida molto concentrata, che ha col citoplasma gli stessi rapporti della goccia di grasso colla cellula adiposa.

Sempre con l'uso del micromanipolatore, portando in prossimità delle singole cellule, mediante una finissima micropipetta, della soluzione di Lugol e dell'alcool, dimostra che l'involucro citoplasmatico che avvolge la gocciola di glicogene si comporta nella cellula vivente come una membrana semipermeabile, che permette il passaggio dei cristalloidi e trattiene il glicogene. Dopo l'azione fissatrice dell'alcool la superficie cellulare diventa permeabile anche al glicogene.

Terni (1) e Levi nel suo trattato di Istologia ricordano gli esperimenti di Olivo, che dimostrano come la membrana delle cellule glicogeniche sacrali viventi sia permeabile ai sali di jodio e impermeabili al glicogene.

(1) Terni T.: La corda dorsale e i tessuti a grandi cellule vescicolose con glicogene (« Mon. Zool. It. », 38, 1927).

II. — Embriologia generale e sperimentale

7\. — Sull'inizio della capacità funzionale dei tessuti contrattili nell'embrione di pollo, in relazione alla loro differenziazione strutturale e morfologica. - I. Differenziazione funzionale e morfologica dell'abbozzo cardiaco (*Rendic. R. Acc. Naz. dei Lincei*, *33*, 209, 1924) (con 1 fig.).

8\. — Id. - II. Differenziazione funzionale e morfologica dei miotomi (*Rendic. R. Acc. Naz. Lincei*, *33*, 297, 1924) (con 1 fig.).

9\. — Differenziazione morfologica e funzionale dei miotomi e del cuore nell'embrione di pollo (*Giorn. R. Acc. Med. Torino*, *87*, 117, 1924).

10. — Sull'inizio della funzione contrattile del cuore e dei miotomi dell'embrione di pollo in rapporto alla loro differenziazione morfologica e strutturale (*Arch. f. exp. Zellf.*, *1*, 427, 1925) (con 18 fig.).

Tema centrale e punto di partenza di queste ricerche è stato il problema dei rapporti esistenti tra la struttura del tessuto contrattile e la sua funzione specifica. La via migliore da seguire sembrò quella dello studio contemporaneo istologico e funzionale dei tessuti contrattili durante l'ontogenesi. Perciò da un lato l'A. cercò di stabilire con la massima precisione possibile, tanto per l'abbozzo cardiaco quanto per i miotomi, il momento della comparsa delle prime miofibrille, dall'altro determinò con precisione l'epoca in cui si inizia la contrattilità spontanea del cuore e la contrattilità per stimoli elettrici nei miotomi. Lo stesso materiale che serviva per gli esperimenti fisiologici veniva controllato istologicamente.

La parte più originale della ricerca è stata la tecnica usata per dimostrare la contrattilità dei tessuti in esame. Ancora nel 1912 F. Bottazzi, ponendo il problema che viene risolto dalle presenti ricerche, prospettava difficoltà tecniche gravi, se non impossibili a superarsi, quando scriveva: « Esiste certamente un periodo iniziale dello sviluppo, durante il quale il condrioma non ha ancora dato origine a vere e proprie miofibrille. Ebbene, durante questo periodo il protoplasma dei mioblasti è già dotato di contrattilità? Ma la questione è assai difficilmente solubile, perchè pare che la comparsa delle prime miofibrille abbia luogo nei primissimi stadi di sviluppo dei mioblasti, quando è, se non impossibile, difficilissimo fare esperimenti fisiologici al fine di vedere se i mioblasti sono contrattili. Ma anche se la fibrillogenesi si iniziasse solo dopo la fusione sinciziale dei mioblasti, questo avvenimento è già per sè tanto precoce che le difficoltà sperimentali non sarebbero minori ».

Cuore e miotomi sono all'inizio della loro attività funzionale organi piccolissimi e della consistenza di una gelatina molto tenue e non si prestano ai metodi abituali di ricerca fisiologica usati per i muscoli. L'A. si servì della tecnica delle colture « in vitro »; cuore e miotomi inclusi in plasma sopravvivono a lungo, danno preparati trasparenti che permettono l'osservazione microscopica con i più forti ingrandimenti, e si trovano inclusi in un mezzo di elasticità sufficiente a mantenere in distensione gli elementi contrattili e che non offre un carico eccessivo agli elementi che si contraggono. Con questo metodo Olivo potè mettere in luce una serie di fatti

attinenti alla fisiologia embrionale dei tessuti contrattili prima poco noti o imprecisi.

I risultati principali sono i seguenti:

1) *Abbozzo cardiaco*. - Le prime contrazioni dell'abbozzo cardiaco nell'embrione di pollo si iniziano comunemente durante la differenziazione della nona coppia di somiti ed eccezionalmente anche prima. Esse sono circoscritte ad una zona estremamente piccola, situata a livello della parte più dilatata dell'abbozzo cardiaco, più frequentemente nella metà sinistra che nella destra. La metà opposta comincia a contrarsi poco dopo, in modo affatto indipendente. Gradualmente una quantità sempre maggiore di tessuto cardiaco acquista la capacità funzionale.

Sino dal loro inizio le contrazioni hanno un ritmo regolarissimo; molto rare dapprima (4 - 5 al minuto), con discreta rapidità si fanno più frequenti e più valide.

Il mantello mioepicardico, all'inizio della sua attività contrattile, è formato da una lamina di aspetto epiteliale composta da uno o due strati di cellule cubiche o prismatiche, intimamente saldate tra loro specialmente in corrispondenza degli spigoli; in nessun punto della parete cardiaca si osservano miofibrille. Le prime contrazioni sono di natura puramente sarcoplasmatica.

Non appena si inizia l'attività contrattile automatica del cuore, esso diventa eccitabile con stimoli elettrici; tale eccitabilità è molto bassa nelle prime ore di attività cardiaca e va in seguito aumentando molto rapidamente.

Nelle singole parti dell'abbozzo cardiaco esiste una grande autonomia di sviluppo; le irregolarità funzionali (asincronicità), che ne possono conseguire scompaiono in breve, perchè ben presto gli stimoli contrattili si possono propagare da una parte all'altra del cuore e le parti a ritmo più frequente trascinano a tale ritmo anche le parti più pigre. Di questi fatti l'A. dà anche la prova sperimentale, confermando gli esperimenti di A. Fischer; anche frammenti isolati di cuore coltivati in vitro a mutuo contatto si contraggono sincronicamente una volta che tra di essi si siano stabilite delle connessioni.

2) *Miotomi*. - La contrattilità dei miotomi per stimoli elettrici compare allo stadio di 27 - 28 somiti, tra la 60ª e la 65ª ora d'incubazione a 38°-39°.

La contrattilità comincia a manifestarsi nei miotomi più craniali per estendersi presto in senso caudale ad un numero sempre maggiore di essi. Le contrazioni dei miotomi avvengono sempre

in direzione cranio-caudale. Esse sono assai lente, tanto nella contrazione che nella decontrazione; la loro ampiezza è minima, appena percettibile ad un ingrandimento di 400 - 500 diametri.

I miotomi in questo stadio sono costituiti da elementi affusati, lunghi circa 150 μ, con un solo nucleo vescicoloso; nel loro citoplasma si trovano numerosi condrioconti lunghi, ondulati, orientati parallelamente all'asse cellulare; tutto il citoplasma ha un aspetto pettinato più o meno evidente nel senso della lunghezza; non vi sono affatto dimostrabili miofibrille.

Col progredire dello sviluppo aumenta negli embrioni l'eccitabilità; le contrazioni si fanno più ampie e più rapide, specialmente nella fase contrattiva.

Tanto la struttura che la contrattilità dei miotomi si sviluppano gradatamente, ma nei miotomi del pollo la contrattilità per stimoli elettrici è dimostrabile prima che sia iniziata la differenziazione dell'elemento citologico specifico della muscolatura volontaria, la miofibrilla striata.

Risulta dimostrato che tanto nei muscoli scheletrici quanto nel cuore la capacità funzionale specifica precede la differenziazione delle miofibrille.

Prima delle ricerche di Olivo il problema dei rapporti tra struttura e funzione dei tessuti contrattili pareva definitivamente risolto dalle ricerche di Galeotti e Levi (1). Questi AA. dimostrarono nelle larve di anfibi, che i più precoci fenomeni di motilità sono apprezzabili soltanto quando nei somiti mesodermici appare qualche miofibrilla striata. Olivo ripetè con tecnica più perfetta gli stessi esperimenti sull'embrione di pollo, tanto per il cuore che per i miotomi e dimostrò in modo chiaro e decisivo che in questo materiale la capacità funzionale contrattile precede nettamente la comparsa delle miofibrille.

B. M. Patten (11) conferma che le prime contrazioni dell'abbozzo cardiaco si hanno allo stadio di 8 - 9 somiti.

Prima di Olivo erano state constatate contrazioni autoctone in cellule isolate, sprovviste di caratteri citologici specifici, da Burrows (2) e da W. H. Lewis (3), osservazioni confermate successivamente anche da Bucciante (4).

Ulteriori conferme sulla capacità contrattile dei miotomi e del miocardio indipendentemente dalla differenziazione delle miofibrille si ebbero da V. Smirnowa (5) e da Nordmann e Ruther (6); questi dicono a pagina 331: « Wir bestätigen also Olivo, dass die Kontraktilität nicht mit bestimmten anatomischen Aussehen Hand in Hand geht ».

Anche le osservazioni sull'automatismo dell'abbozzo precoce del cuore embrionale di pollo furono confermate da Cohn (7), da Bisceglie e Bucciardi (già citati a pag. 13) e da L. Garofolini (8).

I risultati di Olivo sono frequentemente citati nella letteratura e accettati senza critiche. Bethe (9) li ricorda nel capitolo della teoria neurogena e miogena della contrazione cardiaca e rimanda il lettore, per l'argomento delle contrazioni cardiache in cellule indifferenti, al lavoro di Olivo (Siehe besonders O. Olivo: Sull'inizio della funzione contrattile ecc., 1925. Hier auch altere Literatur). G. Levi si occupa a lungo di queste ricerche di Olivo nel suo Trattato di Istologia, 1927 (pag. 242, 583 e segg.) e ne accetta le conclusioni; riporta pure 4 figure (113 A e B, 376, 377). Krontowski (già citato a pag. 13) ricorda la tecnica seguita da Olivo per la registrazione cronometrica delle contrazioni e i risultati. Bisceglie e Juhasz-Schaeffer (già citati a pag. 13) nel capitolo della Fisiologia muscolare al quesito sui rapporti tra struttura e funzione e sul momento dello sviluppo embrionale in cui i mioblasti diventano contrattili, dicono (pag. 229): « Die schönsten Arbeiten in dieser Richtung sind Olivo und Krontowski su verdanken » e si occupano a lungo nelle pagine che seguono delle ricerche di Olivo. Se ne occupano pure A. Fischer (Trattato), Rotheberger (10) e altri.

(1) Galeotti e Levi: Sui rapporti tra differenziazione morfologica e funzionale nei muscoli delle larve di anfibi (« Arch. f. Entw. mech. der Org. », 37, 1913).

(2) Burrows M. T.: Rhytmische Kontraktionen der isolierten Herzmuskelzellen ausserhalb des Organismus (« Münchener med. Wocheschr. », 59, 1912).

(3) Lewis W. H.: Cultivation of embryonic heart-muscle (Pubb. n. 363 of the Garnegie Inst. of Washington, 1926).

(4) Bucciante L.: Contrazioni autoctone in frammenti di miocardio embrionale di pollo coltivati « in vitro » (« Bull. d'Histol. », 4, 1927).

(5) Smirnowa V.: Zur Kenntnis der Entdifferenzierung des Muskelgewebes « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 7, 1928).

(6) Nordmann M. u. Ruther A.: Ueber die Schlagtätigkeit des explantierten Herzmuskels von Hunh und Ratte und ihre Beziehung zum Reizleitungssystem (« Arch. f. exu. Zellf. », 11, 1931).

(7) Cohn A.: Physiological ontogeny. A chicken embryos. 6° Differentiation in the chicken embryos heart from the point of stimulus production (« Journ. of exp. Med. », 42, 1925).

(8) Garofolini L.: Rhythmical contractions of single heart muscle cells in tissue culture « in vitro » (« Proc. of the Physiol. Soc. Journ. Physiol. », 63, 1927).

(9) Bethe A.: Vergleichende Physiologie der Blutbewegung (Handb. der norm. u. path. Physiol., V. 7, Springer, Berlin, 1926).

(10) Rotheberger C. Y.: Normale u. pathologische Physiologie der Rhytmik und Koordination des Herzens (« Erg. der Physiol. », 32, 1931).

(11) Patten B. M.: The initiation of the cardiac contraction in chick embryos (« Anat. Record Suppl. », 48, 1931).

11. — Sull'istituirsi della sincronicità tra le pulsazioni di frammenti di cuore embrionale di pollo e di colombo, coltivati insieme « in vitro » (*Arch. f. exp. Zellf.*, *2*, 191, 1925) (con 8 fig.).

E' una conferma e allo stesso tempo una documentazione più ampia delle ricerche di A. Fischer sull'istituirsi della sincronicità di contrazione tra frammenti distinti di cuore embrionale di pollo, che pulsano con ritmo differente. A differenza di A. Fischer, Olivo ottiene la sincronicità di pulsazione anche tra frammenti di cuore appartenenti a specie differenti (pollo e colombo).

Gli esperimenti di A. Fischer (1) e di Olivo, che dimostrano l'istituirsi della sincronicità delle pulsazioni tra frammenti indipendenti di cuore a ritmo diverso, quando si facciano concrescere in vitro, furono confermati da Katsunuma, Mayehawa, ecc. (2) e da Nordmann e Ruther (già citati a pag. 28).

Olivo, in accordo con Fischer, ha dedotto dal fatto dell'istituirsi della sincronicità tra i frammenti, che tra i loro elementi specifici si debbano stabilire delle anastomosi. In realtà la prova morfologica di questo fatto non è ancora stata data da nessuno e d'altra parte il solo reperto funzionale non giustifica una tale conclusione. Olivo si è convinto da esperimenti posteriori (39), che la conduzione dell'eccitamento alla contrazione può trasmettersi anche attraverso elementi individualizzati. Quando nei frammenti di cuore al 7°-8° giorno d'incubazione interviene la sdifferenziazione, gli elementi del cuore si individualizzano, e ciò non per tanto la sincronicità della pulsazione di tutto l'espianto si conserva. Anche nel cuore all'inizio della sua contrattilità è dubbia l'esistenza di anastomosi tra i mioblasti; e non esiste ancora traccia del futuro sincizio cardiaco.

A. Fischer discute ampiamente i risultati di Olivo nel suo trattato « Gewebezüchtung » a pag. 238 e seguenti per sostenere che tra frammenti di cuore della stessa specie è possibile ottenere unità funzionale e non invece tra frammenti di cuore appartenenti a specie differenti. L'obbiezione di A. Fischer, che nel primo caso si ottenga sincronicità e simultaneità e nel secondo soltanto sincronicità dovuta a cause meccaniche, non ha fondamento. Tra frammenti di cuore di pollo e di colombo si ottiene la stessa identica simultaneità che tra frammenti di cuore di pollo, e il metodo della semplice ispezione, usato tanto da Fischer che da Olivo, non è certamente adeguato a giudicare della velocità di trasmissione dell'eccitamento in frammenti di tessuto di meno di 1 mm. di diametro. La stessa difficoltà che Fischer trova ad ammettere le connessioni tra frammenti di cuore appartenenti a specie differenti, dovrebbe pure trovarla ad ammetterle tra frammenti di cuore della stessa specie. Da questi rilievi critici risulta che ha poco valore l'argomento portato da Fischer a sostegno della sua tesi della struttura sinciziale delle colture e della circolazione nel protoplasma vivente di sostanze o principi, chiamati « desmoni », che passano da cellula a cellula attraverso ponti protoplasmatici.

In quanto al problema generale della tolleranza reciproca di elementi appartenenti a specie differenti, e della possibilità di unità funzionali si

hanno risultati ben più importanti e decisivi nella produzione di chimere e nei trapianti xenoplastici.

Juhász (3) ha ottenuto in vitro la concrescenza di frammenti di tessuti svariati provenienti da specie differenti e conferma con ciò la reciproca tolleranza.

Gli esperimenti di Fischer e di Olivo sono frequentemente citati nella letteratura e accettati nelle loro conclusioni senza discussione: Bethe, 1926; Bisceglie e Juhász-Schaeffer, 1928; Krontowski, 1928; Harrison, 1928 (tutti già citati); Murray (4); Brandt (5).

(1) Fischer A.: The interaction of two fragments of pulsating heart tissue (« Jour. of exper. Med. », 39, 1924).

(2) Katsunuma, Mayehawa, Takano u. Suzuki: Beobrachtungen von Kontraktionen der verschiedenen Fragmente des Herzmuskels und der Magendarm sowie Gallenblasenwandmuskulatur in vitro (« Trans. Jap. Path. Soc. », 19, 1929).

(3) Juhász A.: Wachstumpolarität bei Gewebezüchtungen in vitro und ihre Beziehungen zur Tuberkuloseimmunität (« Arch. f. exp. Zellf. », 6, 1928).

(4) Murray M. R.: The cultivation of planarian tissues in vitro (« Jour. exp. Zool. », 47, 1927).

(5) Brandt W.: Grundzüge einer Konstitutionsanatomie (Verl. J. Springer, Berlin, 1931).

29. — Sulla precoce determinazione del materiale destinato a formare il cuore dell'embrione (*Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, *3*, 9, 1928).

33. — Ueber die frühzeitige Determinierung der Herzanlage beim Hühnerembryo und deren histologische und phisiologische Differenzierung « in vitro » (con 2 tavole) (*Verh. Anat. Ges.*. *37*.Vers, 108, 1928; *Anat.*, Anz. *66*, 108.

34. — Précoce détermination de l'ébauche du coeur dans l'embryon de poulet et sa différenciation histologique et physiologique « in vitro » (con 13 figure) (*C. R. Ass. des Anat.*, *23*, 1928).

In queste ricerche l'A. si pose il problema della determinazione del materiale cardiogeno nell'embrione di pollo. Sono uno sviluppo ulteriore delle ricerche fatte per determinare l'inzio della contrattilità cardiaca.

Con tecnica molto delicata l'A. operò più di 100 tra embrioni precoci e blastodermi e dei risultati ottenuti diede documentazione esauriente e minuziosa.

Nella prima parte di queste ricerche dimostrò la capacità di autodifferenziazione « in vitro », tanto istologica che funzionale,

dell'abbozzo cardiaco ancora indifferente. A cominciare da embrioni di 8 - 10 somiti, per continuare con embrioni sempre più giovani, l'A. isolò l'abbozzo cardiaco che coltivò « in vitro » e dimostrò che l'abbozzo cardiaco dell'embrione di pollo isolato e coltivato « in vitro » prima della sua differenziazione istologica e funzionale nel vivente, può iniziare la sua attività contrattile e la differenziazione istologica delle miofibrille anche nelle nuove condizioni abnormi di vita.

Nella seconda parte di queste ricerche l'A. isolò da blastodermi sempre più precoci la presunta area cardiaca, che coltivò « in vitro », mentre il blastoderma operato veniva fissato e sezionato in serie. Con questo procedimento dimostrò che l'abbozzo cardiaco dell'embrione di pollo è determinato verso la fine del processo di segmentazione dell'uovo, cioè in uova appena deposte e non ancora incubate. A partire da questo momento esso è capace di auto-differenziarsi funzionalmente e strutturalmente «in vitro».

Il materiale cardiogeno è nettamente delimitato dai tessuti che stanno attorno. La specificità dell'abbozzo cardiaco, intesa nel senso di capacità all'autodifferenziazione unita a capacità di accrescimento tale per cui i nuovi elementi che si formano sono dotati dello stesso potere di autodifferenziazione, aumenta dal termine della segmentazione dell'uovo fino all'inizio della segmentazione del mesoderma.

I risultati di queste ricerche confermano quanto Ekmann pochi anni prima e Goerttler contemporaneamente ad Olivo, avevano ottenuto negli anfibi (rana, tritone, axolotl), cioè la precoce determinazione del blastema cardiaco in seno al mesoderma allo stadio di gastrula e di doccia midollare aperta.

La comunicazione dei risultati di Olivo alla 37ª riunione dell'Anatomische Gesellschaft suscitò molto interesse (vedi « Verh. der Anat. Ges. » 37.Vers., 1928). Tra i soci che parteciparono alla discussione, Goerttler confermò le ricerche di Olivo, ricordando la sua dimostrazione dell'autodifferenziazione del presunto mesoderma cardiaco negli anfibi. Petersen rilevò le nuove possibilità di indagine sperimentale, che venivano offerte dal metodo di sperimentazione usato per la prima volta da Olivo per questi problemi.

Queste ricerche furono prese in considerazione e accettate da successivi AA. e da trattatisti: Stöhr (1), Grodzinski (2), Korschelt (già citato a pag. 21), Brandt (già citato a pag. 30), Chiarugi (3) (riproduce anche una figura), Levi (4).

Quest'ultimo autore scrive a pag. 12: « L'unico importante contributo al problema della determinazione col metodo della coltivazione « in vitro »

fu dato da Olivo ». E ne riferisce riassuntivamente i risultati, riproducendo una figura.

Anche Ekman ricorda le ricerche di Olivo in un suo lavoro più recente (5) e scrive: « Viel weiter, als es bis jetzt bei den Amphibien gelungen ist, hat neuerdings (1928) O. M. Olivo die Determination des Herzens beim Huhn verfolgen können. Durch Züchtung von Anlagematerial « in vitro » ecc. » (pag. 330). « Es ist übereinstimmend bei Amphibien und Vögeln festgestellt worden, dass die erste und zugleich wichtigste Phase, die Pulsdetermination, ungemein früh stattfindet. Beim Huhn hat Olivo in Zellgruppen, die schon am Ende des Furchungsprozesses explantiert wurden, mit der Zeit Pulsation beobachtet. Bei den Amphibien hat man ähnliches für das Herzmesoderm der älteren Gastrula festgestellt » (pag. 341).

« Obgleich die Pulsationspotenz somit sehr früh in den betreffenden Zellen entstanden ist, kann diese doch mit der Zeit noch verstärkt werden, was u.a. daraus hervorgeht, dass die Dauer der Schläge im Explantat beim Huhn innerhalb gewissen Grenzen um so länger wird, je später das auspflanzen vorgenommen ist (Olivo) » (pag. 342).

(1) Stöhr Ph. jr.: Zur embryonalen Herztransplantation (« Wilh. Roux' Arch. f. Entw. mech. der Org. », 116, 1929).

(2) Grodzinski Z.: Area vasculosa de poulet sans embryon («C. R. Ass. Anat.», 26, 1931).

(3) Chiarugi G.: Trattato di Embriologia, vol. II (Soc. Libr. Ed., Milano, 1932).

(4) Levi G.: Determinazione e specificità dei tessuti (« Arch. It. di Anat. e Istol. Pat. », 1, 1930).

(5) Ekman G.: Experimentelle Untersuchungen über die früheste Herzentwicklung bei Rana fusca (« Arch. f. Entw. mech. der Org. », 116, 1929).

III. — Istologia ed istogenesi

18. — Sulla migrazione di neuroblasti coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. Biol. Sper.*, *1*, 90, 1926).
19. — Comportamento del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per più settimane « in vitro » (con 12 figure) (*Boll. Soc. Biol. Sper.*, *1*, 509, 1926).
24. — Migrazione di elementi nervosi coltivati « in vitro » (*Arch. f. exp. Zellf.*, *4*, 43, 1927) (con 12 fig.).
25. — Differenziazione e sdifferenziazione del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per più settimane « in vitro » (con 9 figure e 2 tavole) (*Arch. f. exp. Zellf.*, *5*, 46, 1927).

R. C. Harrison (1907 - 1913) fu il primo a coltivare in un mezzo artificiale (linfa di rana) il tessuto nervoso. Con questo mezzo

diede la dimostrazione della capacità di accrescimento autonomo delle fibre nervose e portò una delle prove sperimentali più decisive in favore della teoria del neurone, che va considerato come unità anatomica, trofica e funzionale. Seguirono numerose conferme (Ingebritsen, Lewis, Levi).

Olivo volle precisare alcuni dati riguardanti il comportamento del tessuto nervoso coltivato « in vitro », che forse non erano stati ancora sufficientemente chiariti dai lavori precedenti.

Nei lavori 18 e 24 si occupa della capacità migratoria dei neuroblasti. Descrive dettagliatamente le varie modalità di spostamento attivo e passivo dei neuroblasti e il meccanismo di accrescimento dei prolungamenti nervosi. La migrazione passiva dei neuroblasti può avvenire o per retrazione del coagulo di plasma, che stacca meccanicamente alcuni elementi dall'espianto, o per stiramento del prolungamento nervoso. La migrazione attiva, più rara ed osservabile con sicurezza soltanto in neuroblasti già isolati, può avvenire o per trazione del prolungamento nervoso, che si spinge con movimento ameboide nel plasma, o per flusso di sostanza dal corpo del neuroblasta in direzione del prolungamento nervoso, o infine per emissione di membrane ialine a funzione e forma simile a quella degli pseudopodi dei fibroblasti.

Quest'ultimo tipo di movimento, che non trova riscontro nello sviluppo normale, è interpretato come un particolare adattamento dei neuroblasti all'ambiente abnorme di vita; tutte le altre forme di movimento trovano riscontro in processi analoghi di migrazione dei neuroblasti, che si osservano durante lo sviluppo normale del tessuto nervoso.

Nei lavori 19 e 25 l'A. si propose un'altra serie di problemi generali attinenti al tessuto nervoso coltivato « in vitro ». 1) Quale è il significato delle fibre che costantemente si accrescono nel plasma; sono esse fibre rigenerate o neoformate? 2) Che cosa avviene dell'espianto; i suoi elementi indifferenti si differenziano in neuroblasti o il processo di differenziazione istologica si arresta? E gli elementi già differenziati vanno incontro ad un processo di sdifferenziazione, come si sa avvenire per elementi di altra natura? 3) L'attività proliferativa degli elementi nervosi, che durante la vita normale si arresta non appena si inizia la differenziazione in neuroblasti, può essere mantenuta più a lungo o esser riaccesa in coltura? A tutti questi quesiti di notevole interesse generale oltre che particolare per l'interpretazione del significato delle colture di tessuto nervoso, l'A. risponde in modo esauriente.

Dall'esame sistematico delle colture viventi, fatte con embrioni di varia età e rinnovate per più settimane di seguito, e dall'esame sistematico degli espianti fissati e tagliati al microtomo, l'A. viene alle seguenti conclusioni:

1) Le fibre che si accrescono nel plasma possono essere tanto fibre rigenerate, quanto fibre neoformate da neuroblasti differenziatisi « in vitro ». Quest'ultima eventualità risulta particolarmente evidente dalle colture di espianti provenienti da embrioni molto precoci (3 - 4 giorni d'incubazione). L'eventualità invece di una rigenerazione di fibre mutilate si ha nelle colture di embrioni più adulti. Ciò è in accordo con quanto Ingebritsen e Levi avevano dimostrato con esperimenti di micrurgia.

2) Negli espianti di embrioni precoci si constata un attivo processo di differenziazione di elementi indifferenti in neuroblasti, non si constata invece mai il processo inverso di sdifferenziazione di neuroblasti.

3) Negli elementi già differenziati in neuroblasti al momento del trapianto « in vitro », e in quelli che si differenziano « in vitro », sembra si possa escludere ogni capacità proliferativa, analogamente a quanto avviene in vivo. Soltanto un piccolo numero di elementi, probabilmente ependimali, non si differenzia e, con i caratteri di un epitelio, prolifera indefinitivamente « in vitro », mentre gli elementi differenziati finiscono col degenerare.

Queste ricerche di Olivo sono molto conosciute e tutti gli Autori posteriori, che si occuparono di coltivazione del tessuto nervoso, le citano e le confermano in molti particolari.

Le modalità della migrazione passiva e attiva dei neuroblasti, descritte da Olivo, furono confermate da Mossa (già citato a pag. 21) e da Lazarenko (1).

Mossa (2) conferma che parte delle fibre, che si accrescono in coltura, sono rigenerate.

Costero (3) conferma la descrizione, data da Olivo, di elementi migranti per vivace attività ameboide, che compaiono tardivamente nelle colture. Sulla natura di questi elementi Olivo aveva manifestato il dubbio che fossero analoghi ad elementi patologici, che compaiono nel tessuto nervoso in varie malattie. Costero si associa a questa opinione e ritiene corrispondano agli elementi granulosi frequenti nei processi infiammatori del tessuto nervoso.

La migrazione di epitelio, proveniente dal tessuto nervoso dopo alcuni giorni di coltura, è stata confermata da Kapel (4), Grigorieff (5), Verne (6), Lazarenko (1), Bauer (7).

Kapel (4) e Verne (6) confermano anche che l'estratto embrionale è

dannoso alla coltivazione del tessuto nervoso e ne accelera i processi di degenerazione.

Sul processo di sdifferenziazione del tessuto nervoso in vitro non vi è accordo perfetto. Kapel ha sotenuto che i neuroblasti si sdifferenziano e con questo meccanismo danno origine all'epitelio, che sopravvive indefinitamente « in vitro ». Olivo ha dimostrato in modo chiaro, mediante l'esame istologico degli espianti (il che Kapel non ha fatto) che gli elementi già differenziati al momento del trapianto « in vitro » e quelli che si differenziano successivamente « in vitro », vanno, nelle ordinarie condizioni di coltivazione, presto o tardi incontro alla regressione e alla morte, e che l'epitelio deriva da elementi ependimali, non differenziatisi. Gli esperimenti e le conclusioni di Olivo sono sostenute, contro quelle di Kapel, da G. Levi (8), il quale riassume così la sua discussione: « Gli elementi di apparenza epiteliale che emigrano da espianti di tessuto nervoso di embrioni di pollo non derivano mai, contrariamente a quanto Kapel si propone di dimostrare, da sdifferenziazione di neuroblasti, bensì, come emerge dalle ricerche di Olivo e come quelle più recenti di Esaki confermano, da elementi rimasti indifferenti dell'espianto; i neuroblasti nelle colture « in vitro » si evolvono ulteriormente oppure regrediscono, mai si sdifferenziano ».

Recentemente anche Martinovic (9) ha sostenuto la sdifferenziazione di cellule nervose; nelle colture della corteccia di gatto neonato avrebbe trovato tutti i gradi di passaggio tra cellule nervose e fibroblasti. Tanto questo reperto, quanto quello di mitosi a carico di cellule nervose differenziate non sono documentati in modo sufficiente e lasciano dubbiosi sulle conclusioni dell'Autore.

G. Levi ricorda in numerose sue pubblicazioni (10, 11, 12, 13, 14) e nel Trattato di Istologia queste ricerche di Olivo. Esse sono pure citate da Péterfi e Kapel (già citati a pag. 23), Bisceglie e Juhasz-Schaeffer (già citati a pag. 13), Esaki (15), Herzog (già citato a pag. 23), Bisceglie (16).

A. Fischer nel suo trattato riporta ampiamente le varie modalità di migrazione dei neuroblasti, descritte da Olivo. T. Péterfi nel capitolo « Das leitende Element » (9° vol. dell'« Handb. der normalen und pathologischen Physiologie », Springer, 1929) scrive: « Die amöboide Bewegung der wachsenden Nervenfortsätze wurde am schönsten durch Harrison, G. Levi und Olivo beobachtet ».

W. Brandt (già citato a pag. 30) scrive: « Zum studium der Differenzierungsvorgänge der Zellen und Gewebe eignen sich weiter neben dieser Züchtungen « in vivo » Züchtungen « in vitro » d. h. in künstlich angelegten Gewebekulturen. Man kann z. B. um nur ein Beispiel herauszugreifen, welches das vorliegende Problem beleuchten mag, das Nervengewebe verschiedener Hühnerembryonen von 3-14tägiges Bebrütung züchten und alle 2 - 3 Tage in neues Nährmedium setzen (Olivo, 1928) ».

E inoltre riassume ampiamente gli esperimenti di Olivo, rilevando specialmente il fatto, da questi dimostrato, dell'importanza che ha l'età degli embrioni sul diverso destino degli espianti coltivati « in vitro ».

(1) Lazarenko T.: Ein Betrag zur Morphologie des Wachstum von embryonalem Nervengewebe « in vitro » (« Arch. f. ex. Zellf. », 11, 1931).

(2) Mossa S.: Ulteriori studi sulla rigenerazione dei neuriti e sulle modificazioni dei neuroblasti dei gangli spinali di pollo coltivati « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 7, 1928-29).

(3) Costero I.: Estudio del comportamiento de la microglia cultivada «in vitro» (« Memorias de la R. Soc. Esp. de Hist. Nat. », 14, 1930).

Id.: Studien an Mikrogliazellen in Gewebskulturen von Gehirn (« Arb. aus dem Staatsints. für exp. Therpie Frankfurt a. M. », 33, 1930).

(4) Kapel O.: Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

(5) Grigorieff L. M.: Differenzierung des Nervengewebes ausserhalb des Organismus (« Arch. f. exp. Zellf. », 11, 1931).

(6) Verne J.: La nevroglie dans les cultures de tissus nerveux (« C. R. Ass. Anat. », 1931).

(7) Bauer K.: Beobachtungen über das Wachstum von Nervengewebe « in vitro » (« Zeitschr. f. mikr. anat. Forschung. », 28, 1932).

(8) Levi G.: Sulla sdifferenziazione delle cellule nervose (« Rend. R. Acc. Naz. Lincei », 7, 1929).

(9) Martinovic P. N.: Survival « in vitro » of explants of the cerebral cortex of the cat cultivated in the cerebrospinal fluid of the young animal (« Arch. f. exp. Zellf. », 12, 1931-32).

(10) Levi G.: Ricerche sperimentali sovra elementi nervosi sviluppati « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 2, 1925).

(11) Id.: Gewebezüchtung. - Methodik der wissenschaftlichen Biologie. - Herausg. von T. Péterfi, Springer, Berlin.

(12) Id.: Determinazione e specificità dei tessuti (« Arch. It. di Anat. e Istol. pat. », 1, 1930).

(13) Id.: Il contributo portato dal metodo della coltivazione « in vitro » alla conoscenza della struttura del tessuto nervoso (« Mon. Zool. It. », 40, 1929).

(14) Id.: Organismo e tessuti (« Scientia », 1930).

(15) Esaki Sh.: New studies of nervous tissues cultured « in vitro » (« C. R. Ass. Anat. », 24, 1929).

(16) Bisceglie V.: Studi sui tessuti espiantati. - III. Le modalità di accrescimento ed i caratteri strutturali delle colture di intestino embrionale di pollo (« Arch. f. exp. Zellf. », 12, 1931-32).

28. — Differenziazione istologica ottenuta « in vitro » del cuore di pollo indifferenziato (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *3*, 9, 1928).

33. — Ueber die frühzeitige Determinierung der Herzanlage beim Hühnerembryo und deren Histologische und physiologische Differenzierung « in vitro » (*Anat.*, Anz. *66*, 108, 1928; *Verh. Anat. Ges.*, 37ª Riun., 1928) (con 2 Tav.).

42. — Differenziazione morfologica e funzionale del tessuto miocardico coltivato « in vitro » e conservazione prolungata delle sue proprietà specifiche (*Mon. Zool. It.*, *40*, 319, 1930) (con 13 fig.).

Con questi esperimenti Olivo per primo ha dimostrato la possibilità di ottenere « in vitro » la differenziazione di elementi ancora indifferenziati. L'A. non si è limitato alla constatazione di fatto per il tessuto miocardico, ma ha precisato tanto le condizioni generali esterne, quanto le proprietà intrinseche ad un determinato tessuto (suo grado di specificità e sua potenzialità prospettiva assoluta e relativa in funzione del grado di sviluppo dell'embrione) che consentono la differenziazione.

In 28 e 33 (1ª parte) si riferiscono i risultati di esperimenti preliminari, che hanno condotto allo studio della determinazione del materiale cardiaco, di cui si è già detto nel paragrafo II a pag. 30). Viene dimostrato che il materiale costituente l'abbozzo cardiaco indifferente e non funzionante può differenziarsi « in vitro » in modo autonomo e in queste condizioni iniziare la sua attività contrattile ritmica.

In 42 dimostra che il tessuto cardiaco embrionale precoce coltivato in un mezzo nutritivo adatto può conservare i caratteri specifici citologici e funzionali per almeno sei mesi. Nessuno prima di Olivo era riuscito a conservare per un periodo di tempo così lungo la contrattilità ritmica di espianti coltivati « in vitro ».

A proposito degli esperimenti di Olivo, H. Petersen (« Verh. Anat. Ges. », 37, 1928, pag. 117) rilevò: « Bisher Vorwiegend Entdifferenzierung, hier erste Schritte progressiver Entwicklung der Gewebe ».

Aron (1) ricorda qualche dato sulla conservazione dei caratteri specifici « in vitro » (epitelio tiroideo, cellule pigmentate della retina, corneificazione dell'epitelio di rivestimento) e prosegue: « Qui plus est, l'ebauche du coeur d'un poulet prélevée au cours du premier jour d'incubation, alors qu'elle se compose d'éléments encore indifférenciés, est capable, selon Olivo, d'engendrer en culture du tissu musculaire peu a peu doué de battements; et des cellules nerveuses, a allégué Harrison, acquièrent « in vitro » ecc. ». - « C'es quelques exemples, dont un résumé trop bref fait encourir le risque de masquer l'importance et de restreindre la signification, suffisent du moin a laisser entrevoir les riches gerbes de découvertes moissonnées en peu d'années, sur le terrain de la physiologie générale par les cultivateurs de tissus ».

Fischer [Trattato (2)] e Fischer e Parker (3) ricordano gli esperimenti di Olivo e della Fell, ma rilevano che si tratta di interi abbozzi di

organi, costituiti da tessuti di natura differente. In realtà Fischer non si è reso conto che Olivo ha lavorato anche con espianti piccolissimi (poche centinaia di cellule) dell'abbozzo cardiaco e che in quelle condizioni non si può parlare di correlazione tra tessuti differenti. Le condizioni sperimentali di Olivo sono ben differenti da quelle della Fell, che ha trapiantato l'intera otociste, o interi abbozzi di arti.

G. Levi ricordò più volte nei suoi scritti questi esperimenti. Riassumendoli in « Scientia » (1930) scrive: « Olivo mediante ricerche estese ed esatte si è proposto di studiare in colture di cuore di embrione di pollo a vita protratta, per quanto tempo si conservano i caratteri strutturali specifici; ed i risultati da lui ottenuti sono così lucidi da non lasciare dubbi ». E più oltre: « Un fatto di grande interesse fu inoltre scoperto da Olivo col coltivare l'abbozzo del cuore durante la prime 24 ore d'incubazione, oppure la zona di germi precocissimi (non incubati) la quale contiene il materiale cardiogeno: in colture ottenute da questi elementi, i quali evidentemente sono ancora indifferenti, Olivo ha visto formarsi « in vitro » miofibrille in gran numero durante oltre un mese di vita della coltura; la differenziazione istologica era associata a differenziazione funzionale, perchè le colture ottenute da quegli abbozzi incominciavano a pulsare « in vitro » dopo un numero di ore vario, a seconda dell'età dell'espianto ».

(1) Aron M.: La culture de tissus (« La Presse Médicale », n. 87, 1930).

(2) Fischer A.: Proliferation und Differenzierung der Gewebezellen « in vitro » (« Protoplasma », 14, 1930).

(3) Fischer A. und Parker R. C.: Proliferation und Differenzierung (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

21. — Sulla ripresa dell'attività ritmica contrattile spontanea di frammenti di cuore di pulcino coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. Biol. Sper.*, *1*, 1926).

22. — Sui fattori della sdifferenziazione strutturale e funzionale degli elementi miocardici di pollo coltivati « in vitro » (*Mon. Zool. It.*, *37*, 69, 1926).

30. — Le proprietà strutturali delle cellule e dei tessuti coltivati « in vitro » (in collaborazione con G. Levi) (con 10 figure) (*Arch. f. exp. Zellf.*, *6*, 46, 1928).

38. — Recenti contributi allo studio della morfologia e biologia dei tessuti coltivati « in vitro » (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *3*, 1229, 1928).

39. — Sulle modificazioni strutturali e funzionali del miocardio di pollo coltivato « in vitro » (con 5 figure) (*Arch. f. exp. Zellf.*, *8*, 250, 1929).

51. — Das qualitative und quantitative Wachstum der Gewebe « in vitro » und dessen Faktoren (con 13 figure) (*Arch. f. exp. Zellf.*, 11, 1930).

Serie di ricerche sul comportamento del tessuto muscolare cardiaco coltivato « in vitro », nelle quali si studiano sempre comparativamente le modificazioni strutturali e quelle funzionali specifiche di questo tessuto. Per la grande quantità di materiale esaminato l'A. presenta dei dati conclusivi ed esaurienti sul processo di differenziazione e sdifferenziazione di questo tessuto quando sia coltivato « in vitro » e sui fattori determinanti tali processi.

Nei lavori 21, 22 e 39 l'A. dimostra mediante l'esame microscopico delle fette seriate, le trasformazioni alle quali sottostanno gli espianti di cuore di pollo già istologicamente differenziati (dal 6° giorno d'incubazione sino all'adulto). nelle prime ore di coltivazione e nei giorni successivi. Nei cuori di embrioni dal 6° all'8° giorno d'incubazione, coltivati in plasma e succo embrionale, si produce una trasformazione rapida di tutti gli elementi dell'espianto, a cominciare dalle parti superficiali di questo, che procede rapidamente verso le parti profonde. Il fenomeno più appariscente, già dopo 12 - 24 ore di coltura, è l'individualità che assumono le cellule del miocardio e la scomparsa delle miofibrille; dopo 4 - 6 giorni è difficile ritrovare delle miofibrille conservate. Tutto l'espianto si trasforma in un ammasso di cellule voluminose, a forma irregolare. Se gli espianti non sono troppo voluminosi, non vi è traccia di degenerazione nelle fibre muscolari e d'altra parte non si apprezza una proliferazione sensibile da parte degli elementi dell'endocardio. Questo fatto dimostra che gli elementi emigrati nel plasma sono in prevalenza mioblasti sdifferenziati.

La sdifferenziazione dei mioblasti coltivati « in vitro » è un fatto costante, obbiettivamente constatato. La velocità di questo processo è molto varia e direttamente proporzionale al grado di maturità istologica raggiunto dalle fibre cardiache.

Negli espianti di cuori di 2 - 3 giorni d'incubazione il processo di sdifferenziazione richiede più di un mese per essere completo; negli espianti di pulcini dopo la schiusa la sdifferenziazione si effettua nel corso di poche ore. Nei cuori più adulti si ha, a differenza di quelli più giovani, degenerazione di molte fibre. L'attività contrattile in atto o meno non ha importanza nel facilitare o arrestare il processo di sdifferenziazione.

Con le modificazioni morfologiche degli espianti vanno di pari passo modificazioni funzionali. Negli espianti di cuori embrionali

molto giovani (5 - 8 - 10 giorni d'incubazione) l'attività contrattile automatica dura più a lungo dei caratteri citologici specifici; dopo alcuni giorni di coltivazione « in vitro » il tessuto pulsa per attività contrattile di natura puramente sarcoplasmatica. Negli espianti di cuori più inoltrati nello sviluppo (da 17 giorni di incubazione sino a 6 giorni dopo la schiusa), i quali durante i primi giorni non si contraggono spontaneamente, ricompare la contrattilità automatica dopo qualche giorno di coltivazione in plasma e succo embrionale. Questo fatto avviene dopo che negli espianti sono scomparse le miofibrille. Queste ultime quindi esercitano un'azione inibitrice sull'automatismo delle fibre muscolari. Questo risultato è particolarmente importante, perchè può segnare la via di conciliazione nel vecchio dibattito tra la teoria miogena e quella neurogena dell'automatismo cardiaco. L'argomento fondamentale della teoria miogena è quello delle contrazioni automatiche del cuore embrionale che precedono l'innervazione dell'organo. Non si è forse tenuto abbastanza conto del fatto che la struttura del cuore embrionale è molto diversa da quella del cuore adulto. La complicazione strutturale, che consiste specialmente nel grande sviluppo della massa miofibrillare, è legata a modificazioni del meccanismo funzionale, che consisterebbero tra l'altro, in base agli esperimenti dell'A., in una graduale riduzione dell'automatismo, al punto che nell'adulto si può benissimo ammettere la necessità di un'attività nervosa per mantenere l'automatismo del cuore. L'automatismo miogeno del cuore embrionale dei primi stadi verrebbe sostituito dall'automatismo neurogeno nell'adulto.

In quanto al significato del processo di sdifferenziazione l'A. oppone un valido argomento contro l'interpretazione che esso sia un ritorno allo stato indifferente degli elementi dell'abbozzo cardiaco.

Nel caso speciale la sdifferenziazione non è processo reversibile. Le fibre sdifferenziate non conservano la capacità di ridifferenziarsi in plasma puro, come gli elementi dell'abbozzo cardiaco ancora indifferenti (vedi sopra). L'A. conclude che durante la sdifferenziazione si sono perduti i caratteri specifici manifesti, ma non si sono riacquistate quelle capacità latenti che sono insite nel mioblasta non ancora differenziatosi. Nel caso speciale quindi la sdifferenziazione rappresenta una sottrazione di facoltà e la si può considerare come una degradazione del valore biologico degli elementi considerati.

In quanto ai fattori della sdifferenziazione morfologica degli

espianti « in vitro » l'A. dimostra che l'estratto embrionale accelera notevolmente il processo. Ad esempio per il cuore di 8 giorni di incubazione, negli espianti piccoli coltivati in plasma e succo embrionale le miofibrille sono completamente scomparse dopo 3 - 4 giorni, in quelli coltivati in plasma e Ringer le miofibrille striate sono ancora abbondantissime dopo 6 giorni di coltura.

I lavori 30 e 38 sono due relazioni presentate a Congressi, nelle quali oltre a molti dati personali riguardanti specialmente il processo della differenziazione e sdifferenziazione del tessuto cardiaco coltivato « in vitro », sono ricordati alcuni dei risultati principali attinenti alla Citologia delle cellule coltivate « in vitro ».

In 51 (1ª parte) Olivo passa in rassegna molti dati personali e tratti dalla letteratura sul processo di differenziazione istologica « in vitro », sulla conservazione prolungata dei caratteri specifici e sul processo di sdifferenziazione, e viene alla seguente conclusione: « Wenn daher auch zwischen den « in vitro » gezüchteten Elementen verschiedener Natur einige Unterschiede als Zeichen ihrer Spezifizität bestehen bleiben, so ist man berechtig, anzunehmen, dass man es im allgemeinen mit einem Entdifferenzierungssprozess zu tun hat, und zwar nicht in dem Sinne, dass alle Zellen nach einem einheitlichen indifferenten Zelltypus streben, sondern dass sie qualitativ und quantitativ einige ihrer kompliziertenen morphologischen und funktionellen Eigenschaften einbüssen, ohne die Möglichkeit, dieselben gänzlich wiederzuerlangen. Dies abgesehen von den Fällen, in denen geradezu eine Degeneration der höher differenzierten Elemente vorliegt, und vorausgesetzt, dass es sich um wahre und wirkliche Kulturen handelt, d. h. um das Fortleben der Elemente eines Gewebes unter unbegrenzten Wachstumserscheinungen ».

Il tessuto cardiaco fu sino dai primi anni della coltivazione « in vitro » materiale di predilezione per molti esperimenti. Da questo tessuto deriva anche il celebre ceppo che Carrel coltiva ininterrottamente da 18 anni. Carrel ed Ebeling sostennero che gli elementi specifici del miocardio vanno in degenerazione e che sopravvivono soltanto i fibroblasti. Levi fu il primo a sostenere invece che gli elementi specifici si sdifferenziano. Seguirono sull'argomento numerosi lavori e primi in ordine di tempo e di importanza quelli di Olivo, che confermano e documentano precisamente le vedute di Levi. Quest'ultimo A. (6) ricorda diffusamente le ricerche di Olivo e scrive: « Il comportamento in vitro del tessuto muscolare del cuore fu con insistenza analizzato; i risultati più conclusivi si debbono ad Olivo ». Dell'opinione di alcuni AA. su quest'argomento e

specialmente sulla natura degli elementi derivanti da espianti di cuore, che migrano e si moltiplicano nel plasma, abbiamo già detto a pag. 20 e seg.).

Rumjantzew (1) cerca di dimostrare (male) che non si ha sdifferenziazione in vitro nel tessuto cardiaco e non tien conto dei lavori di Olivo.

A. Fischer nel suo Manuale « Gewebezüchtung » ribadisce il vecchio concetto di Carrel. A. pag. 143: « Ein Stück Herz wird beispielweise in ein gewisses Medium gebracht. Die Muskelzellen und einige andere Zelltypen sterben sehr schnell ab. Dies wird ausdrücklich von Levi und seinen Mitarbeiten bestritten, da sie die Fibroblasten von Herzgewebe als Myoblasten aussehen. Die Frage ist also auf jeden Fall so lange als unerledigt zu betrachten, wie man noch nicht nachweisen kann, dass die jahrelang gezüchteten Herzfibroblasten wieder Kontraktionsfähig sind ». Fischer non tiene nel dovuto conto gli esperimenti di Olivo, che hanno dimostrato in modo irrefutabile che gli elementi muscolari non degenerano, ma si sdifferenziano (12, 13, 22, 23, 39) e le considerazioni teoriche di Olivo (38) secondo le quali nei mioblasti coltivati a lungo « in vitro » si avrebbe una degradazione del valore biologico con perdita definitiva della capacità contrattile. Che per dimostrare l'origine mioblastica degli elementi delle colture si debba necessariamente riuscire a ristabilire la contrattilità dei mioblasti sdifferenziati, come sostiene Fischer, è un'affermazione aprioristica non convalidata da nessun argomento. Quello che al momento attuale si può concludere con sicurezza, in base alle osservazioni obbiettive di Olivo, è che gli elementi muscolari del miocardio di pollo di 6 - 8 giorni d'incubazione si sdifferenziano e danno origine a cellule, che si moltiplicano attivamente e sono morfologicamente eguali ai fibroblasti, che si ottengono dal connettivo propriamente detto; se poi tra questi elementi delle colture provenienti rispettivamente da mioblasti sdifferenziati o da fibroblasti esistano delle differenze quantitative nella capacità di accrescimento non è ancora provato.

I fattori della sdifferenziazione illustrati da Olivo sono riassunti diffusamente da G. Levi nel Trattato di Istologia (pag. 267), dove riporta anche 2 figure.

Wassermann (già citato a pag. 23) ricorda a proposito del problema della sdifferenziazione le ricerche di Olivo. Le stesse ricerche sono ricordate e accettate senza discussione da Aron (già citato a pag. 38).

Ephrussi (2) discute il problema della sdifferenziazione e fa un esame critico profondo delle conclusioni di Champy, basandosi specialmente sugli esperimenti di Olivo. Riferisce estesamente i dati del lavoro 39, dopo aver detto: « Mais, d'autre part, l'erreur de Champy repose sur l'emploi de techniques défectueuses et c'est pourquoi je vais citer l'exemple d'un autre étude, réalisée par Olivo dans des conditions d'une

technique impeccable, avant de passer à la citation des faits qui apportent une preuve directe de la non-dedifférenciation des tissus in vitro ».

I fattori della sdifferenziazione indicati da Olivo sono ammessi tra l'altro da Garofolini (3 - 4), Aron, Ephrussi. Il metodo di Fischer e Parker (5) per ottenere colture senza accrescimento nè sdifferenziazione deriva dal fatto, dimostrato da Olivo, che l'estratto embrionale determina la sdifferenziazione.

(1) Rumjantzew A.: Beobachtungen über die Entwicklung des Herzmuskelgewebes bei Embryonen von Hühnern « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 4, 1927).

(2) Ephrussi B.: Résultats rècents de la culture des tissus (« Ann. et Bull. de la Soc. R. des Sciences Méd. et Nat. de Bruxelles », 1931).

(3) Garofolini L.: Ricerche su colture di tessuti « in vitro ». - I. Attività contrattile di singoli mioblasti in espianti di cuore embrionale di pollo (« Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 2, 1927).

(4) Id.: Id. II. Cellule epatiche ed endotelio in colture di fegato embrionale (« Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 2, 1927).

(5) Fischer A. u. Parker R. C.: Dauerzüchtung « in vitro » ohne Wachstumsbeschleunigung (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

(6) Levi G.: Determinazione e specificità dei tessuti (« Arch. It. di Anat. e Istol. Pat. », 1, 1930).

26. — Risultati dell' innesto nell'allantoide (metodo Murphy-Rous) dei tessuti coltivati « in vitro) (in collaborazione con F. Corinaldesi) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper., 2,* 717, 1927).

Vengono comunicati in forma riassuntiva i risultati di una serie molto numerosa di esperimenti eseguiti per studiare i vari fattori determinanti la differenziazione e la sdifferenziazione dei tessuti e le differenze inerenti a tessuti di varia natura.

Frammenti di tessuto cardiaco, di tessuto connettivo, di ovaio e di mesonefro embrionali vengono trapiantati direttamente nell'allantoide secondo il metodo di Murphy-Rous, o vi vengono trapiantati dopo un certo periodo di coltivazione « in vitro ».

Il miocardio attecchisce tanto « in vitro » che nell'allantoide (in questa attecchisce più facilmente dopo coltivazione « in vitro »); va sempre incontro al processo di sdifferenziazione che è più rapido nell'allantoide.

Il connettivo fibroso coltivato « in vitro » si sdifferenzia per digestione delle fibre collagene; le colture sdifferenziate trapiantate nell'allantoide non si riorganizzano in tessuto fibroso.

Nell'ovaio coltivato « in vitro » manca l'evoluzione degli ovociti, che decorre invece in modo abbastanza tipico nei trapianti

nell'allantoide. Ovaia trapiantate nell'allantoide anche dopo sole 48 ore di coltivazione « in vitro » non si evolvono più in modo normale.

Nel mesonefros coltivato « in vitro » gli elementi epiteliali degenerano facilmente. Il mesonefros trapiantato nell'allantoide sia direttamente che dopo coltivazione « in vitro » evolve normalmente.

L'influenza del mezzo (coltivazione « in vitro » o allantoide) è diversa a seconda della natura dell'organo da cui si preleva il frammento per l'espianto.

44. — Differenziazione « in vitro » di fibre collagene (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *5*, 2, 1930).

L'A. espone in forma riassuntiva i risultati di alcuni esperimenti sulla produzione di fibre collagene « in vitro ». Nelle culture in goccia pendente la sostanza fondamentale del connettivo viene digerita e scompare; quando la scomparsa della sostanza fondamentale sia completa (dopo 1 - 2 mesi), le colture vengono trapiantate in piastre di Carrel. Lasciandole sempre nella stessa piastra, senza rimuovere il plasma, si osserva, nelle sezioni microtomiche delle colture, dopo 4 - 8 settimane la produzione di abbondanti fasci collageni. Si tratta di un processo di organizzazione del plasma; non ha importanza se il liquido nutritivo stimola o meno la proliferazione cellulare, l'essenziale è che le cellule abitino a lungo lo stesso coagulo. Nelle colture fatte col ceppo di Carrel (vecchio di 16 anni) la fibrillogenesi è molto più scarsa che nelle colture isolate da pochi mesi dall'embrione; si può perciò concludere che queste cellule conservano, seppure forse un poco attenuata, la proprietà biologica specifica di produrre fibrille collagene.

Queste ricerche vanno estese per vedere se davvero cellule, che probabilmente sono mioblasti, hanno il potere di formare fibre collagene, il che non è inverosimile.

Poco prima degli esperimenti dell'A. (fatti all'Istituto Rockefeller nel 1928 - 29) Fischer e Parker (1) avrebbero ottenuto la differenziazione di vari tessuti connettivi (connettivo pr. d., cartilagine, osso) da fibroblasti coltivati in vitro da 7 - 9 mesi, abolendo dal terreno nutritivo il succo embrionale. In realtà in nessuna delle figure portate dagli AA. a dimostrazione dei fatti descritti si riconosce la struttura tipica delle sostanze fondamentali che essi vi riconoscono. Dalle figure si ha l'impressione che le sostanze fondamentali non siano altro che il coagulo variamente trasformato ed indurito. Dei fatti così importanti richiedono una documentazione più accurata.

Fischer e Parker invocano come fattore della differenziazione l'assenza di sostanze stimolanti l'accrescimento. Ma anche in ciò vi è forse un errore di interpretazione. Nelle colture eseguite in solo plasma le cellule cessano presto di moltiplicarsi e perciò restano relativamente rade nel plasma; in quelle fatte con succo embrionale vi è moltiplicazione attiva e quindi le cellule sono stipate nel plasma; il sustrato rappresentato dal coagulo si comporta in modo affatto passivo ed è quindi improprio parlare di « sostanza fondamentale », poichè con questo termine si intende indicare di solito la sostanza specifica prodotta tra cellula e cellula durante l'accrescimento dei tessuti connettivi. Olivo ha dimostrato invece che i fibroblasti, e forse anche i mioblasti, hanno la capacità di organizzare il coagulo di plasma in fasci di aspetto fibrillare tipico, eguali morfologicamente e per le proprietà tintoriali alle fibrille collagene tipiche, ma non osservò aumento assoluto di sostanza fondamentale, fatto che attende ancora di essere dimostrato. In quanto ai fattori determinanti l'organizzazione del plasma in fasci collageni ha poca importanza la presenza di sostanze stimolanti l'accrescimento; la si ottiene anche usando nelle piastre di Carrel il succo embrionale come d'abitudine: solo è necessaria la permanenza delle cellule per lungo tempo nello stesso coagulo.

Olivo non si è occupato della differenziazione di fibrille reticolari e precollagene, che, come è noto dalle ricerche di Maximow (2) e di Momigliano (3), si formano già nei primissimi giorni di coltivazione.

Le osservazioni di Olivo sono ricordate da von Mollendorf, 1932, citazione a pag. 59.

(1) Fischer A. u. Parker R. C.: Proliferation und Differenzierung (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

(2) Maximow A.: Ueber die Enstehung von argyrophilen und kollagenen Fasern in Kulturen von Bindegewebe und von Blutleukozyten (« Zentralbl. f. allg. Path. », 43, 1928).

(3) Momigliano-Levi G.: Ricerche sulla istogenesi delle fibre collagene e reticolari nelle colture « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 11, 1931).

IV. — **Accrescimento organico**

17. — Modificazioni di forma e di grandezza delle cellule piramidali della circonvoluzione centrale anteriore umana durante l'accrescimento somatico (in collaborazione con G. Gagliano) (*Boll. Soc. Biol. Sper.*, *1*, 111, 1926).

58. — Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. - VI. Grandezza delle cellule dei gangli spinali del pollo (in collaborazione con E. Porta e L. Barberis) (con nove figure) (*Arch. It. Anat. Embr.*, *29*, 1932).

Queste ricerche fanno parte di un esteso piano organico di studi sull'accrescimento, diretti specialmente a precisare analiticamente e con criteri quantitativi il valore dei singoli fatti materiali che contribuiscono all'accrescimento.

In esse l'A. si è proposto di portare un contributo al problema di grande interesse generale posto e svolto da G. Levi nel 1905 e in seguito, e cioè l'interpretazione delle cause determinanti la differente grandezza dei neuromi.

Nel lavoro 17 sono esposti riassuntivamente i dati di numerose osservazioni fatte sulle cellule piramidali della corteccia umana. L'A. arriva alla conclusione che le grandi cellule piramidali della circonvoluzione precentrale umana presentano durante la vita postnatale modificazioni di forma e di grandezza.

Alla nascita l'arborizzazione dendritica è quanto mai abbondante ed è destinata in parte a ridursi durante i primi anni di vita; i singoli dendriti, sottilissimi alla nascita in tutto il loro decorso, si fanno in seguito sempre più voluminosi e di forma conica nel loro tratto iniziale; col progredire dell'età un numero sempre maggiore di dendriti confluiscono nel loro tratto iniziale in grossi tronchi comuni, inoltre durante il decorso hanno tendenza ad emettere in numero sempre maggiore delle collaterali. Per tali modificazioni nell'origine dei dendriti i corpi cellulari, nettamente piriformi alla nascita, si fanno in seguito piramidali e più o meno irregolari di forma.

La grandezza massima raggiungibile dalle cellule aumenta progressivamente in modo molto sensibile durante il periodo dell'accrescimento corporeo. Verso il termine di tale accrescimento alcuni neuroni hanno raggiunto la grandezza massima raggiungibile durante la vita dell'individuo, mentre altri neuroni, che in tale epoca sono ancora arretrati nel loro accrescimento, continuano ad aumentare di volume in seguito, e alcuni di essi possono raggiungere la loro grandezza definitiva anche in età molto avanzata (50-60 anni).

Nel lavoro 58 l'A. ha studiato in modo esauriente l'accrescimento delle cellule di un ganglio intervertebrale del pollo su 18 esemplari, seriati esattamente in rapporto all'età di sviluppo. Ha seguìto un criterio statistico di esame, misurando per ogni esemplare più di 1000 cellule e costruendo dai dati ottenuti delle curve di frequenza delle varie grandezze cellulari in ogni età. In questo modo ha confermato alcuni dati concernenti l'accrescimento delle cellule gangliari già noti e ha messo in evidenza alcuni dati o nuovi o più precisi e obbiettivi di quelli che già si trovano nella lettera-

tura di questo argomento. Le conclusioni principali a cui arriva sono le seguenti:

1) Per quanto si riferisce all'aumento numerico delle cellule nervose dei gangli conferma le ricerche di Morpurgo e Tirelli, che cioè tale aumento avviene tutto in un periodo molto precoce dello sviluppo. A partire dall'8° giorno d'incubazione (stadio 85 di Keibel) non ha più trovato mitosi a carico di elementi destinati a differenziarsi in neuroblasti.

2) La variabilità della grandezza delle cellule nervose nei gangli spinali è un fatto costante sino dalle fasi precoci dello sviluppo (4° giorno di incubazione). L'ampiezza della variabilità aumenta in misura assoluta con l'età, di pari passo con l'accrescimento dei neuroni. Tale aumento di variabilità è dovuto al differente accrescimento assoluto delle cellule e non al fatto che alcune cellule, le grandi, crescano e altre, le piccole, restino stazionarie. Il rapporto tra cellule piccole e grandi si modifica dando una sproporzione sempre maggiore sino a 15 giorni dopo la nascita, in seguito le proporzioni restano inalterate.

3) La velocità di accrescimento delle cellule gangliari, tanto della media globale di tutte, quanto quella dei gruppi di differente grandezza (cellule piccole e grandi e classi intermedie), molto grande durante il periodo embrionale, decresce gradatamente, in modo rapido prima, poi sempre più lentamente, senza arrivare allo zero neanche dopo 6 mesi di età, presentando una depressione marcata nei primi giorni dopo la nascita.

In rapporto alla differente grandezza delle cellule si osserva che dal 6° giorno di incubazione fino a 15 giorni dopo la nascita la velocità di accrescimento è tanto maggiore quanto più grandi sono le cellule. Questo fatto fa aumentare in tale periodo la sproporzione tra cellule piccole e grandi, tanto in senso assoluto che relativo. Dal 15° giorno di vita in poi la velocità di accrescimento è pressochè eguale in tutte le cellule, di modo che il rapporto tra cellule piccole e grandi resta costante.

4) Nel pollo le cellule relativamente piccole dei gangli spinali dell'adulto non possono aver significato di elementi immaturi di riserva, destinati a rimpiazzare quelli invecchiati. L'A. ritiene perciò che fino dai primi giorni dopo la nascita tutti i neuroblasti siano impegnati in una certa misura nelle funzioni nervose sensitive del pulcino, e che l'aumento delle necessità funzionali nervose inerenti all'accrescimento corporeo sia compensato da un'ipertrofia uniforme di tutte le cellule del ganglio.

5) Per il rapporto tra accrescimento somatico e accrescimento delle cellule nervose nei gangli del pollo l'A. conferma in linea di massima la legge di Levi, che dice essere l'accrescimento dei neuroni direttamente proporzionale all'accrescimento corporeo, ma non conferma i dati di quegli AA., che hanno creduto di trovare un rapporto quantitativo costante tra superficie corporea e volume delle cellule gangliari. L'accrescimento delle cellule gangliari precede l'accrescimento corporeo, come avviene in generale per l'accrescimento di tutto il sistema nervoso centrale. Il punto di flesso della curva ad S, che segna l'accrescimento delle cellule gangliari si trova verso la metà del periodo di sviluppo embrionale; quello invece della superficie corporea si trova tra il 2° e il 3° mese di vita postnatale. Inoltre dopo il 6° mese, mentre l'accrescimento corporeo è quasi ultimato, continua benchè in piccola misura l'accrescimento delle cellule gangliari.

Il lavoro 17 è riassunto da G. Levi nel Trattato di Istologia (pag. 744) dove è pure documentato da 2 figure, e da L. Castaldi in « Accrescimento corporeo e costituzioni dell'uomo » (pag. 176 e 182).

31. — Sulla durata dell'intercinesi nelle cellule coltivate « in vitro » (in collaborazione con lo stud. E. De Lorenzi) (*Rend. R. Acc. Naz. Lincei, 7*, 936, 1928).

32. — Frequenza delle mitosi nel cuore embrionale di pollo a vari stadi di sviluppo e nelle colture « in vitro » dello stesso materiale (in collaborazione con lo stud. E. Slavich) (*Rend. R. Acc. Naz. Lincei, 7*, 1061, 1928) (con 2 fig.).

40. — Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. - I. Accrescimento ponderale, coefficiente mitotico dell'accrescimento e durata della mitosi e dell'intercinesi nel cuore embrionale di pollo (in collaborazione con lo studente E. Slavich) (*Wilh. Roux' Arch. f. Entw. mech. d. Org., 121*, 96, 1930) (con 2 fig.).

41. — Id. - II. Coefficiente mitotico dell'accrescimento negli espianti di cuore di pollo coltivati « in vitro » (in collaborazione con lo stud. E. Slavich) (*Wilh. Roux' Arch. f. Entw. mech. d. Org., 121*, 408, 1930) (con 4 fig.).

57. — Id. - III. Coefficiente mitotico dell'accrescimento, distribuzione topografica e cronologica delle mitosi e durata dell'intercinesi nella zona di migrazione delle colture « in vitro » ricavata con l'osservazione diretta (in collaborazione con lo stud. E. De Lorenzi) (*Arch. f. exp. Zellf., 13*, 1932) (con 8 fig.).

L'A. studia con unità di indirizzo l'accrescimento del cuore embrionale del pollo nel vivente e nei frammenti coltivati « in vitro ».

Nei lavori 32 e 40 si determina la curva di accrescimento ponderale del cuore dalle pesate di circa 100 cuori a vario stadio di sviluppo, a partire dal 4° giorno di incubazione.

Per tutto il periodo della vita embrionale e sino a 10 giorni dopo la nascita si determina a distanza di 2 giorni da un'osservazione all'altra, il coefficiente mitotico dell'accrescimento (n. di cellule in mitosi per 1000 cellule in riposo, Champy). I valori ottenuti indicano per un determinato tessuto il numero di cellule per 1000 che si dividono per mitosi durante lo spazio di tempo eguale alla durata media della mitosi.

Il coefficiente mitotico dal 2° giorno d'incubazione al 10° dopo la schiusa diminuisce progressivamente da 22 ‰ a 0 ‰.

Dai coefficienti mitotici e dall'incremento in peso si calcola indirettamente la durata della mitosi, che risulta di 38 minuti. E' la prima volta nella letteratura che viene usato un simile accorgimento per determinare la durata assoluta del processo mitotico in organi dove l'osservazione diretta non è possibile. Dagli stessi dati è stata calcolata pure la durata media dell'intercinesi.

Dal confronto tra i coefficienti mitotici delle varie età e l'accrescimento percentuale ponderale, si deduce che l'ipertrofia degli elementi cardiaci, come importante fattore dell'accrescimento, interviene soltanto verso la fine del periodo di incubazione.

Nel lavoro 41 sono esposti i risultati di osservazioni fatte sul coefficiente mitotico dell'accrescimento degli espianti coltivati « in vitro » del tessuto cardiaco. Durante l'ontogenesi il tasso di accrescimento per mitosi va gradatamente diminuendo. L'A. si domanda: Che cosa avviene se poniamo nello stesso mezzo nutritivo attivante l'accrescimento dei pezzetti di tessuto cardiaco a vario stadio di sviluppo e dei quali ci sono noti i coefficienti mitotici al momento dell'espianto « in vitro »?. Si ottiene immediatamente un incremento dell'attività mitotica dell'espianto o solamente dopo un certo periodo di tempo?

L'A. fa tre serie di espianti con cuori al 3°, 7° e 15° giorno di incubazione, che posseggono i coefficienti mitotici 21, 15 e 4 ‰ e che vengono coltivati in condizioni identiche. Durante i primi giorni in tutti gli espianti il coefficiente mitotico si abbassa sempre di più rispetto a quello di partenza, soltanto dopo 6 - 8 giorni tende a risalire. I coefficienti mitotici diminuiscono maggiormente, tanto

in misura assoluta che relativa, negli espianti di cuori più giovani. Da queste osservazioni l'A. trae le seguenti conclusioni:

1) Il determinismo delle mitosi nel cuore embrionale non è regolato soltanto da fattori estrinseci. Le proprietà inerenti alle cellule hanno importanza notevole, poichè altrimenti non si spiegherebbe la diminuzione progressiva del coefficiente mitotico negli espianti per più giorni di seguito, ed il fatto che nelle tre serie di espianti i coefficienti mitotici restano sempre disposti nello stesso ordine decrescente, che avevano al momento dell'espianto « in vitro ».

2) Negli espianti di embrioni di 7 e 15 giorni di incubazione l'attività mitotica aumenta nuovamente dopo che la sdifferenziazione degli espianti è completa; negli espianti di embrioni di 3 giorni l'attività mitotica aumenta molto prima che sia avvenuta la sdifferenziazione. Quindi, per quanto il processo di sdifferenziazione abbia non dubbia importanza nell'aumento del coefficiente mitotico, il rapporto tra i due processi non è stretto; fino a un certo grado attività mitotica e differenziazione possono essere dissociate. Un fattore importante dell'attività mitotica è l'architettura del tessuto e la sua compattezza.

3) I fattori che durante lo sviluppo normale diminuiscono il coefficiente mitotico sono probabilmente da ricercarsi in prima linea nelle proprietà intrinseche dei mioblasti, che in determinate condizioni si differenziano progressivamente ed è poco probabile che durante la vita embrionale si mettano in circolo sostanze ad azione generale capaci di diminuire in modo così rapido e sensibile il coefficiente mitotico del tessuto cardiaco.

In 31 e 57 sono riferiti i risultati di esperimenti per precisare le modalità di moltiplicazione delle cellule nella zona di migrazione delle colture « in vitro », in confronto alle modalità che si hanno negli espianti coltivati « in vitro » e nel tessuto miocardico « in vivo ». Furono impiegati elementi provenienti dal cuore embrionale di pollo al 7° giorno di incubazione, coltivati per un periodo vario di tempo in goccia pendente di plasma e estratto embrionale.

Mediante l'osservazione diretta è stato determinato: 1) per singole piccole popolazioni di cellule (25 - 70) e per la durata di parecchie ore (7 - 17) la frequenza delle mitosi e la loro distribuzione topografica e cronologica; 2) la durata assoluta dell'intercinesi in singole cellule e in cellule gemelle; 3) mediante il calcolo è stato determinato in base ai dati degli esperimenti, il coefficiente

mitotico e la durata media dell'intercinesi per ognuno di essi; 4) per la distribuzione cronologica delle mitosi si è controllato mediante il calcolo di probabilità se essa era fatta in modo accidentale o se presentava il fenomeno della periodicità.

La frequenza delle mitosi nella zona di migrazione è risultata sempre più elevata che negli espianti. I coefficienti mitotici medi stanno tra 21 ‰ e 32 ‰ tanto in colture al primo trapianto che in quelle del ceppo di Carrel al 2591° trapianto.

Questi valori sono quindi spesso superiori anche a quelli massimi osservati nel cuore « in vivo » (22 ‰ al 2° giorno di incubazione). Il coefficiente mitotico così elevato nella zona di migrazione in confronto a quello dell'espianto (7,6 ‰ come media massima) è attribuito oltre che ad altri fattori, specialmente al fatto che le cellule che migrano nel plasma subiscono profonde modificazioni morfologiche e funzionali, che sono espressione dell'adattamento di questi elementi alle nuove condizioni ambientali.

La durata dell'intercinesi è risultata, sia dalle determinazioni indirette che da quelle dirette, variabile. Le differenze nelle osservazioni dirette vanno da 7 a 21 ore.

In base a considerazioni teoriche si viene alla conclusione che la durata dell'intercinesi delle cellule coltivate « in vitro » segue le leggi della variabilità fluttuante. L'ampiezza delle variabilità si conserva costante attraverso le varie generazioni di cellule, come la variabilità della grandezza nelle linee pure di Johannsen.

Lo studio statistico della distribuzione cronologica delle mitosi dimostra che tale distribuzione è irregolare; intervalli di tempo, ora brevi, a volte molto lunghi, che separano due mitosi successive, si osservano approssimativamente con la stessa frequenza che si può prevedere col calcolo della probabilità. Come la distribuzione cronologica, anche quella topografica è puramente accidentale. Quindi nelle colture « in vitro » non si può parlare di attività mitotica ritmica. Si arriva così al concetto già altre volte espresso dall'A. che le cellule della coltura rappresentano una colonia di elementi indipendenti, e non già individualità organiche di ordine superiore. Tra le singole cellule si possono stabilire quelle correlazioni reciproche, che si hanno in qualsiasi popolazioni di organismi anche dei più autonomi e indipendenti.

Dall'esame critico di alcuni dei principali dati della letteratura (Kornfeld, Gurwitsch) si conclude che sinora nè per le colture « in vitro » e nemmeno per i tessuti dell'organismo non è stata data la dimostrazione dell'esistenza di fattori estrinseci regolatori del-

l'accrescimento, agenti direttamente sul processo mitotico. Con ogni verosimiglianza l'attività mitotica è funzione del metabolismo e anche gli stimoli ormonici o energie radianti o altri stimoli che possono influire sull'accrescimento, agiscono non solo direttamente sul processo mitotico, ma agiscono anche sul periodo preparatorio, cioè durante l'intercinesi.

G. Levi riassume ampiamente queste ricerche in « Scientia » (1930) a pag. 28 e seg. e conclude: « E' quindi dimostrato che dei due fenomeni più essenziali che sono il fondamento strutturale dell'ontogenesi, la differenziazione e la moltiplicazione cellulare, il primo è, almeno sino ad un certo punto, autonomo e dipende adunque da proprietà insite alla cellula, il secondo è regolato dall'organismo ».

J. Schmalhausen (1) prende in considerazione le ricerche di Olivo e ne riferisce in questi termini: « Es ist gut verständlich, dass, je seltener die Zellen sich teilen, d.h. je länger die interkinetische Periode dauert, desto seltener in einem Gewebe Mitosen angetroffen werden (bei der Vorbedingung, dass die Dauer der Mitose selbst durchschittlich konstant bleibt, was scheinbar tatsächlich zutrifft, vgl. O. Olivo 1928). Also kann die Aenderung der Frequenz der Mitosen, also die Aenderung des sogenannten mitotischen Koeffizienten in differenzierten Geweben, uns eine Vorstellung über die tatsächliche Verengerung der von Teilung bis Teilung verlaufenden Zeitspanne geben. Dass der mitotische Koeffizient in differenzierten Geweben des Embryos fortwährend herabsinkt, zeigen sehr schön die Untersuchungen von O. Olivo welcher den Wert des mitotischen Koeffizienten im embryonalen Herzen des Hühnchens bestimmte (vgl. Tabelle 5) ». La tabella è presa dai dati di Olivo.

Le osservazioni sulla distribuzione topografica e cronologica delle mitosi sono ampiamente riassunte da Ephrussi, 1930 (già citato a pag. 43).

W. Brandt (già citato a pag. 30) nel capitolo « Einfaches Wachstum » scrive: « Die Gewebskultur ermöglicht weiter die Wachstumsgeschwindigkeit genau zu studieren, den mitotischen Koeffizienten zu ermitteln und in Beziehung zu setzen zu verschieden altem Gewebe und zu verschiedenen Medien ». « Der mitotische Koeffizient als wesentlicher Wachstumsmassstab ist das Verhältnis zwischen den im Momente der Fixierung des Gewebes in Teilung befindlichen und den ruhenden Zellen, multipliziert mit 1000 (Champy) ».

« Heráusgegriffen sei aus der grossen Zahl der Beobachtungen folgendes Experiment (Olivo und Slavich, 1930): etc. » e segue un riassunto molto esteso del lavoro 32.

Love (2) ha utilizzato i dati del lavoro 31 unitamente a quelli di altri AA. per alcuni calcoli teorici.

L. Bucciante (3) prende in considerazione le ricerche pubblicate nelle due note 31 e 32.

(1) Schmalhausen J.: Das Wachstumsgesetz als Gesetz der progressiven Differenzierung (« W. Roux' Arch. f. Entw.mech. der Org. », 132, 1930).

(2) Love Wm.H.: The occurrence of mitosis in tissue cultures (« Arch. f. exp. Zellf. », 10, 1930 - 31).

(3) Bucciante L.: Studi sulla durata del periodo cinetico ed intercinetico in embrioni di pollo incubati a differente temperatura (« Arch. f. Entw. mech. der Org. », 115, 1929).

45. — Sulla velocità di accrescimento « in vitro » di elementi mesenchimali isolati da organi differenti (in collaborazione con E. Porta) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper., 5,* 330, 1930).

E' una breve nota riassuntiva di alcuni esperimenti fatti per controllare i risultati di Parker (1). Secondo questo A., i fibroblasti provenienti da differenti organi dell'embrione (osteoblasti, condroblasti, fibroblasti dei muscoli scheletrici e del miocardio), presentano notevoli differenze nella loro energia residuale d'accrescimento e la loro velocità di accrescimento è diversamente influenzata da eguali percentuali di sostanze nutritive contenute nel terreno di coltura.

I risultati di Olivo fanno arrivare alla conclusione che è assai poco probabile, o per lo meno non sufficientemente dimostrato, che elementi mesenchimali provenienti da differenti organi manifestino, se coltivati « in vitro », velocità differenti, specifiche e costanti di accrescimento, dovute a differenti proprietà biologiche intrinseche degli elementi possedute già al momento del loro prelevamento dall'embrione.

(1) Parker R. C.: Physiologische Eigenschaften mesenchymaler Zellen « in vitro » (« Arch. f. exp. Zellf. », 8, 1929).

48. — Durata delle mitosi nelle cellule embrionali del cuore e del fegato embrionale del pollo (in collaborazione con E. Porta) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper., 6,* 1, 1931).

49. — Differenze nell'accrescimento ponderale, coefficiente mitotico dell'accrescimento e durata della mitosi tra fegato e cuore embrionale di pollo (in collaborazione con E. Porta) (*Mon. Zool. It., 41,* 1931) (con 2 grafici).

L'A. si propone di studiare comparativamente le modalità di accrescimento del cuore e quelle di un organo epiteliale.

Con lo stesso metodo usato per il cuore embrionale di pollo, l'A. determina per il fegato la curva di accrescimento ponderale assoluto e il coefficiente mitotico dell'accrescimento. Da questi dati

calcola indirettamente la durata media delle mitosi nella cellula epatica. Essa risulta sensibilmente più breve (23 min., 20 sec.) di quella dei mioblasti del cuore (38 min.). Di questo fatto non si avevano prima delle determinazioni dell'A. dei dati sicuri.

Per poter stabilire un confronto tra i due organi studiati, nei quali la durata della mitosi risulta differente, viene calcolato per entrambi il coefficiente mitotico orario, cioè il numero di mitosi per 1000 cellule che si effettuano nella stessa unità di tempo. Dal confronto tra cuore e fegato si rileva che il fegato comincia a crescere in peso più tardi del cuore, ma con velocità sensibilmente più grande, dimodochè lo raggiunge e sorpassa al 7° giorno di incubazione. Il coefficiente mitotico orario è sensibilmente più elevato nel fegato che nel cuore, specialmente durante i primi 12 giorni di incubazione.

Il fatto caratteristico, e già da lungo tempo conosciuto, dell'eterocronia dell'accrescimento ponderale dei vari organi durante lo sviluppo, trova riscontro, per il cuore e il fegato, in un'analoga eterocronia nell'attività cariocinetica dei due organi.

46. — Accrescimento ponderale e coefficiente mitotico dell'accrescimento nel cuore embrionale di pollo incubato a temperatura inferiore alla normale (*Boll. Soc. It. Biol. Sperim., 5,* 882, 1930).

47. — Experiments on the differentiation and growth of the cardiac tissue in chicken embryos (*4th Poultry Congress, London,* 1930).

50. — Accrescimento ponderale e coefficiente mitotico dell'accrescimento nel cuore di embrioni di pollo incubati a temperature differenti (*Mon. Zool. It., 41,* 206, 1931) (con 2 grafici).

L'A. eseguì una serie di esperimenti per verificare l'influenza della temperatura sulla curva di accrescimento ponderale del cuore e per stabilire se il coefficiente temperatura influisce in misura eguale o meno sulla durata della mitosi e dell'intercinesi.

L'A. riuscì ad ottenere tre serie di embrioni di pollo dal 3° giorno di incubazione sino a termine, incubate rispettivamente alla temperatura normale di 39°,5 e a quelle più basse di 36°,5 e 34°,5. Alle temperature inferiori al normale lo sviluppo dell'embrione risulta ritardato di 4 - 5 giorni, ma è apparentemente armonico in tutte le parti. L'accrescimento ponderale del cuore è rallentato nella prima metà del periodo di incubazione; nella seconda

metà invece si accelera tanto da raggiungere e superare il peso del cuore normale.

Con lo stesso procedimento usato per il cuore e per il fegato è stata calcolata indirettamente la durata della mitosi; essa risultò prolungatata del 7 % rispetto alla durata a temperatura normale; l'intercinesi invece risultò allungata circa del 16 % nella prima metà del periodo di incubazione e abbreviata di più del 50 % nella seconda metà del periodo di incubazione.

L'A. si propone di continuare gli esperimenti per chiarire il meccanismo e i fattori, che determinano questo strano comportamento del cuore di fronte all'abbassamento della temperatura di incubazione.

Fin d'ora arriva alle seguenti conclusioni:

1) La durata dell'intercinesi media nel cuore dell'embrione di pollo è variamente influenzata dagli abbassamenti di temperatura nei vari periodi dello sviluppo, dapprima è prolungata rispetto alla norma, avvicinandosi al termine dello sviluppo è abbreviata in misura sempre più grande.

2) Abbassandosi la temperatura di incubazione la durata media dell'intercinesi si modifica in misura differente dalla durata della mitosi.

52. — Migrazione e mitosi nelle colture « in vitro » (in collaborazione con lo stud. E. De Lorenzi) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *6*, 811, 1931).
53. — Coefficiente mitotico di espianti coltivati « in vitro » in rapporto a differenti terreni nutritivi (in collaborazione con lo stud. G. Gomirato) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *6*, 821, 1931).
54. — Azione inibitrice dell'accrescimento delle colture « in vitro » da parte del coagulo di plasma invecchiato (*Mon. Zool. It.*, *42*, 1932).
56. — Coefficiente mitotico dell'accrescimento delle colture « in vitro » in plasma ipotonico (in collaborazione con lo studente G. Gomirato) (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 7, 1932).

Sono brevi note riassuntive in cui l'A. riferisce esperimenti sui fattori dell'accrescimento delle colture « in vitro ».

In 52 si è occupato della migrazione e della mitosi nelle colture « in vitro »; ha studiato sistematicamente su materiale embrionale di varia età se vi è correlazione tra l'attività cariocinetica negli espianti coltivati e l'attività migratoria delle cellule che costitui-

scono la zona di migrazione. Fu dimostrato che i due fenomeni sono relativamente indipendenti, perchè differenti sono gli ordini di fattori che favoriscono o inibiscono rispettivamente la migrazione, oppure l'attività cariocinetica.

In 53 dimostra che gli espianti di tessuto cardiaco prelevati da embrioni di differenti età reagiscono in modo differente a terreni di coltura variati, ricchi o poveri di sostanze nutritive stimolanti l'accrescimento. Conclude che durante l'ontogenesi il tessuto miocardico che si va differenziando va soggetto a graduale modificazione del suo metabolismo, per cui non possiede sempre la stessa capacità di utilizzare le sostanze proteiche eterogenee, che sono messe a sua disposizione nel terreno di coltura.

(54) L'accrescimento delle colture di fibroblasti fatte in goccia pendente e rinnovate ogni 2 giorni, segue una curva esponenziale. Invece l'accrescimento protratto di una coltura in piastra di Carrel per uno o più mesi, va gradatamente attenuandosi fino a diventare praticamente nullo. Sui fattori che possono inibire l'accrescimento protratto nelle piastre sono state avanzate parecchie ipotesi.

L'A. con una serie di esperimenti molto dimostrativi mette in luce che un fattore preponderante dell'azione inibitrice dell'accrescimento risiede nell'invecchiamento del coagulo di plasma. In esso si presume vadano formandosi sostanze chimiche, per ora non identificate, che gli esperimenti dimostrano essere dotate di netta e sensibile azione deprimente l'accrescimento in coltura. Di tale fatto bisogna tener conto nell'interpretazione degli esperimenti sull'accrescimento organico fatti col metodo delle colture « in vitro » per non cadere in errori nelle induzioni speculative che si è condotti a fare.

In 56 l'A. espone riassuntivamente alcuni esperimenti sull'azione dell'ipotonicità del mezzo di coltura sulla velocità di accrescimento. Su questo argomento vi erano nella letteratura delle colture « in vitro » dei dati insufficienti ed inesatti.

L'A. dimostra i seguenti fatti:

1) Il coefficiente mitotico di espianti di cuore embrionale sia di 3 che di 7 giorni di incubazione, coltivati in plasma reso ipotonico con l'aggiunta di un'eguale quantità di acqua distillata, è sempre, in media, inferiore al coefficiente mitotico del cuore normale di età corrispondente.

2) Il coefficiente mitotico di espianti coltivati in plasma ipotonico, confrontato con quello di espianti coltivati in plasma nor-

male, per il cuore di 7 giorni di incubazione, e per 4 trapianti successivi, è maggiore; nel cuore di 3 giorni di incubazione invece il coefficiente è superiore al primo trapianto, si fa in seguito notevolmente più basso. E' possibile che analoga diminuzione del coefficiente mitotico si abbia anche per il cuore di 7 giorni, ma soltanto in un periodo più tardivo.

3) E' singolare che i coefficienti mitotici del cuore di 3 giorni di incubazione, coltivati in plasma ipotonico sieno sempre e sensibilmente inferiori a quelli degli espianti di 7 giorni di incubazione, pur partendo da un coefficiente mitotico originario più elevato. Questo fatto dimostra che in uno stesso tessuto il modo di reagire di fronte ad un determinato agente esterno si modifica in rapporto al differente grado di differenziazione istologica che il tessuto ha raggiunto. In questo senso si conferma e si estende la legge di Carrel, che ogni tessuto ha un punto optimum suo proprio di accrescimento rispetto ai vari fattori estrinseci fisici e chimici differente da quello di altri tessuti; tale differenza esisterebbe anche per lo stesso tessuto nei vari gradi della sua maturità istologica.

43. — Capacità di accrescimento illimitato di colture di poche cellule (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *5*, 2, 1930).

61. — Potenzialità di accrescimento di poche cellule somatiche isolate (*Mon. Zool. It.*, *43*, 1932) (con 2 fig.).

L'A. riferisce alcuni esperimenti, che dimostrano in modo decisivo l'individualità delle cellule delle colture e la capacità che esse hanno di moltiplicarsi anche se isolate in numero molto ridotto. L'importanza biologica del fattore quantitativo per l'attecchimento di batteri e protozoi sia in colture artificiali che nei processi infettivi, e per l'attecchimento dei tumori trapiantati in serie è ben conosciuta. Per le colture « in vitro » era stata affermata specialmente da A. Fischer l'incapacità di moltiplicazione e di accrescimento di poche cellule isolate.

L'A. ha trovato un espediente tecnico per isolare pochissime cellule (6 - 10 o poche diecine) in modo da non ledere menomamente le cellule.

Tra molti esperimenti con risultato negativo, in 14 riesce ad ottenere accrescimento da meno di 100 cellule e in questi tre volte l'accrescimento è ottenuto con meno di 10 cellule; da una coltura di 26 cellule ottiene accrescimento illimitato e cellule rigogliose come quelle normali.

Resta così dimostrato per la prima volta che anche pochissime cellule (6 - 10 - 26) possono accrescersi e fornire delle colture ad accrescimento illimitato.

I risultati esposti in questa breve nota sono riferiti anche nel lav. 51.

G. Levi (1) riassume e commenta così questo lavoro: « Olivo ha potuto dimostrare che non sono esatti i risultati di A. Fischer, che per ottenere accrescimento illimitato occorre non sia oltrepassato un minimo di grandezza dell'espianto; al disotto di questo minimum l'accrescimento si arresta. Olivo con un ingegnoso metodo ha dimostrato che si può ottenere accrescimento ulteriore anche da pochissime cellule; e da un gruppo di 26 cellule ottenne un ceppo a vita permanente. L'Autore giustamente rileva che gli insuccessi che di solito si ottengono coltivando espianti di un numero limitatissimo di cellule risalgono a ragioni tecniche; la preparazione di espianti così piccoli, non può a meno di comprometterne l'integrità. La dottrina di A. Fischer, secondo la quale la necessità di un minimum di sostanza per avere colture positive è in relazione colla presenza di connessioni intercellulari (desmoni), non s'accorda con questo importante risultato di Olivo ».

Le conclusioni di A. Fischer sono state contraddette anche da Wright (2).

(1) Levi G.: Relazione sull'opera scientifica dell'Istituto Anatomico della R. Università di Torino (1930 - 31), Ed. « Minerva Medica ».

(2) Wright G. P.: The relative duration of the various phases of mitosis in chick fibroblasts cultivated « in vitro » (« Jour. Roy. Mich. Soc. », 1925) (Citato da Gray Y. M. A.: Experimental Cytology, Cambridge, Univ. Press, 1931).

51. — Das qualitative und quantitative Wachstum der Gewebe « in vitro » und dessen Faktoren (*Arch. f. exp. Zellf.*, *11*, 1931) (con 13 fig.).

In una relazione sintetica l'A. riassume i risultati principali degli esperimenti sull'accrescimento delle colture, basandosi specialmente sui suoi esperimenti personali, in parte pubblicati e in parte ancora inediti.

G. Levi ricorda questa pubblicazione nella sua « Relazione sull'opera scientifica dell'Istituto Anatomico di Torino » (1930 - 31) così: « Olivo ha presentato al Congresso di Citologia sperimentale di Amsterdam una relazione sull'accrescimento qualitativo e quantitativo dei tessuti « in vitro » e sui loro fattori. In questa relazione sono riassunte ricerche dell'Autore in parte pubblicate, in parte inedite. La memoria è così densa di fatti, che non può essere qui riassunta ».

A Fischer (1) cita da questo lavoro il metodo di Olivo per lo studio dell'accrescimento basato sulla determinazione del coefficiente mitotico.

W. von Möllendorff (2) riferendosi a questa relazione dice (pag. 132):

« Sehr bemerkenswert sind die Ausführungen von O. M. Olivo (1930) über die Erhaltung des Selbstdifferenzierungsvermögen in verschiedenem, explantiertem Material des Embrionalkörpers » ; e a pag. 154 : « Wir sind bei der Verwendung der Kulturen in einer besseren Lage als beim Experimentieren am Organismus, weil wir, wie oben schon angedeutet, in den Kulturen lebende Masse vor uns haben, die nur die allgemeinsten Eigenschaften der lebenden Masse bewahrt hat. Wir können auch, besonders angesichts der Ausführungen von O. M. Olivo (1930) ausschliessen, dass bei dem konstruktiven Aufbau ein dem Organismusleben des Kulturmaterials entsprechendes Selbsdifferenzierungsvermögen eine Rolle spielt ; denn wir haben Zellen wom erwachsenen Organismus vor uns, die ihre natürliche Differenzierungsleistung abgeschlossen hatten, als sie zur Kultur gewonnen wurden ».

(1) Fischer A. : Ueber Regenerationsproblem. Untersuchungen an Gewebezellen « in vitro » (« Protoplasma », 14, 1931).

(2) von Möllendorf W. : Das Mutterstück von Bindegewebskulturen. Ein Beitrag zur Frage, wie konstruktive Fasersysteme und Hartsubstanzen entstehen (« Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat. », 15, 1932).

V. — **Morfologia causale - Rigenerazione**

35. — Rigenerazione di organi sensitivi in Amiurus nebulosus (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *3*, 1019, 1928).

L'A. espone in modo riassuntivo i risultati di un numero molto rilevante di esperimenti, fatti sull'Amiurus nebulosus per stabilire l'importanza che ha il sistema nervoso nei processi di degenerazione e di rigenerazione delle papille gustative e nei processi di degenerazione e di rigenerazione degli intieri tentacoli, che sono la sede più ricca di papille gustative.

L'A. conferma i risultati principali che avevano già ottenuto Olmsted e May e rettifica qualche dettaglio.

Gli esperimenti consistettero nel taglio semplice o ripetuto dei nervi sensitivi delle papille gustative ; nell'estirpazione completa di lunghi tratti dei nervi sensitivi ; nella deviazione dei nervi sensitivi verso aree cutanee differenti ; nell'amputazione di intieri tentacoli e deviazione del loro nervo sensitivo.

Le conclusioni che se ne traggono sono le seguenti :

1) Risulta confermato quanto era già noto circa il rapporto diretto esistente tra degenerazione e rigenerazione delle papille gustative in Amiurus nebulosus e la degenerazione e rigenerazione delle fibre nervose che le innervano.

2) Resta dimostrata l'importanza diretta che hanno le fibre nervose sensitive nei fenomeni rigenerativi, non solo degli organi specifici terminali di senso (papille gustative), ma anche dell'apparato più complesso portatore di questi organi, i tentacoli, i quali rigenerano in modo perfetto, compreso il loro apparato scheletrico cartilagineo, soltanto con la cooperazione del sistema nervoso.

3) L'innervazione normale è indispensabile non solo alla persistenza e al funzionamento regolare dell'organo terminale (papille gustative), ma anche alla conservazione degli interi tentacoli, che, quando sieno definitivamente denervati, vanno lentamente in atrofia.

4) Il nervo di un tentacolo, deviato in una zona cutanea della stessa natura di quella che innervava, può determinare in essa l'accrescimento in superficie e la costituzione di nuove papille gustative.

36. — Effetto delle ferite sulla rigenerazione delle cellule negli organi della linea laterale di Axolotl (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, *3*, 1027, 1928).

59. — Rigenerazione sperimentale degli organi della linea laterale di Axolotl e azione sugli stessi di ferite cutanee fatte in loro prossimità (*Arch. di Sc. Med.*, *56*, 1932) (con 19 fig.).

L'A. si propose di trattare con questi esperimenti di rigenerazione degli organi sensitivi della linea laterale alcuni problemi morfogenetici generali secondo l'indirizzo della sintesiologia e della teoria degli istomeri di Heidenhain. Forse non tutti i fatti obbiettivi di osservazione rispondono alla concezione teorica di Heidenhain.

Le presenti ricerche sono soltanto lavori preliminari del problema vasto e complesso, di cui l'A. si sta ancora occupando.

Gli organi della linea laterale di Axolotl rigenerano in modo perfetto entro 30 - 40 giorni dall'asportazione, qualora sia rimasta in corrispondenza della sede dell'operazione una parte dell'epitelio specifico derivato dal primitivo abbozzo degli organi della linea laterale. La rigenerazione viene invece a mancare anche a distanza di 3 mesi dall'operazione in quei casi nei quali con gli organi stessi sia asportata in modo completo tutta l'isola di epitelio specifico contenente un determinato gruppetto di organi per modo che in sito non vi sia rimasto più dell'epitelio proveniente dal primitivo abbozzo. I singoli organi sensitivi che rigenerano si formano ognuno in modo indipendente dagli altri, non si consta-

tano mai nè forme di gemmazione nè di scissione in calici sensitivi già esistenti.

Mediante ferite o amputazione di estese aree epiteliali in prossimità di organi della linea laterale, si è cercato di ottenere artificialmente uno stimolo proliferativo nelle cellule sensoriali che costituiscono gli organi, ed arrivare così ad un ingrandimento abnorme degli organi stessi.

I fatti, che si sono potuti constatare, sono i seguenti:

Gli organi della linea laterale sono come ancorati sul derma sottostante, probabilmente dalla loro connessione con le fibre nervose che li innervano; quando, per asportazione di estese aree epiteliali in prossimità degli organi, ai margini della ferita si ha un vasto movimento di scorrimento dell'epitelio integro verso le superfici depitelizzate, si osserva che gli organi sono investiti dalle cellule migranti, ma non vengono mai rimossi.

Le ferite in prossimità degli organi della linea laterale determinano in questi, dopo 24 ore, una frequenza delle mitosi più che tripla rispetto al normale, benchè si tratti di elementi specifici a funzione differente da quella dell'epitelio asportato e che non partecipano a colmare le perdite avvenute nell'epitelio di rivestimento.

Cagionando sempre nuove lesioni ogni 24 ore in prossimità degli stessi organi, la cresciuta attività mitotica perdura immodificata per 5 giorni, poi si va abbassando. Si ottiene così un lieve ingrandimento del diametro degli organi, senza che per questo vi sia il menomo accenno ad un processo di scissione degli organi.

L'aumento dell'attività mitotica, determinata dopo 24 ore, negli organi della linea laterale da lesioni fatte in vicinanza, manca quando piccole aree cutanee contenenti gli organi sensitivi vengano isolate completamente dall'epitelio circostante, per asportazione intorno ad essi di una cornice completa di epitelio.

I risultati di questi esperimenti non si accordano con la teoria degli istomeri di Heidenhain, secondo la quale questi organi si dovrebbero considerare come istomeri dotati della potenziale capacità a dividersi e a moltiplicarsi.

37. — Differenziazione di miofibrille nell'abbozzo cardiaco dell'embrione di pollo coltivato « in vitro » indipendentemente dall'attività funzionale (*Boll. Soc. Biol. Sper.*, *3*, 1041, 1928).

E' una nota riassuntiva di alcuni esperimenti che rispondono al problema seguente: Esiste un rapporto causale tra attività fun-

zionale e genesi delle miofibrille del miocardio? Possono le miofibrille differenziarsi anche a prescindere dall'attività funzionale?

L'A. ha dimostrato in ricerche precedenti (10), che l'attività contrattile precede la differenziazione delle miofibrille ed ha pure dimostrato (28 - 33) che l'abbozzo cardiaco istologicamente e funzionalmente ancora indifferente può differenziarsi in modo autonomo « in vitro ».

Approfittando del fatto che il cloruro di potassio inibisce l'attività contrattile ritmica [fatto pure dimostrato nelle colture dall'A. (6)], l'A. fece sviluppare « in vitro » l'abbozzo cardiaco non ancora pulsante dell'embrione di pollo in plasma contenente un eccesso di cloruro di potassio. In queste condizioni gli abbozzi cardiaci si accrescono come di norma, ma non pulsano mai. Dopo alcuni giorni di coltivazione in questo ambiente le colture venivano fissate e all'esame istologico si constatava la presenza di una quantità più o meno grande di miofibrille trasversalmente striate. Se gli espianti così trattati vengono lavati prima della fissazione in liquido di Ringer, essi si mettono immediatamente a pulsare.

Resta quindi dimostrato che i mioblasti dell'abbozzo cardiaco hanno la capacità di compiere la loro evoluzione morfologica e precisamente di differenziare delle miofibrille, anche se fino dalla loro prima formazione viene inibita la loro attività funzionale specifica. I mioblasti acquistano precocemente durante l'ontogenesi proprietà tali, per cui sono in grado di compiere la loro evoluzione morfologica senza bisogno del concorso di un'azione formativa da parte della funzione in atto. Durante lo sviluppo del tessuto contrattile cardiaco è possibile dissociare lo sviluppo strutturale del tessuto dalla sua attività funzionale.

VI. — Pubblicazioni didattiche

39 bis — Lezioni di Biologia generale (con 257 fig.) (Ed. litografica F. Gili, Torino, 1929 - 30).

Sono riassunte le lezioni (circa 70 - 76) che l'A. svolse come Professore incaricato, nel corso annuale di Biologia generale presso la R. Università di Torino. Hanno soltanto lo scopo di facilitare agli studenti la preparazione all'esame. Sono trattati i seguenti argomenti:

1) Proprietà fisico-chimiche della sostanza organizzata. Dif-

ferenze tra sostanza vivente e non vivente. Vitalismo e meccanismo - (pag. 8 - 45).

2) Morfologia generale della cellula. Teoria cellulare della costituzione della sostanza organizzata - (pag. 46 - 82).

3) Analogie e divari tra organismi animali e vegetali. I batteri. Circolazione della materia tra mondo organico ed inorganico - (pag. 82 - 105).

4) Proprietà vitali della cellula: *a*) Ricambio materiale ed energetico; *b*) Fenomeni di movimento; *c*) Eccitabilità della cellula. Tropismi e tassi; *d*) Riproduzione delle cellule. Mitosi. Proprietà generali dei cromosomi - (pag. 106 - 217).

5) Spermatogenesi ed ovogenesi - (pag. 218 - 237).

6) La fecondazione - (pag. 238 - 269).

7) La partenogenesi - (pag. 269 - 286).

8) Polarità e simmetria bilaterale dell'uovo - (pag. 293-301).

9) La segmentazione nei vari tipi di uova - (pag. 302 - 329).

10) Gastrulazione e formazione dei foglietti primitivi nell'Anfiosso, Anfibi e Mammiferi - (pag. 330 - 346).

11) Modo di origine degli organi primitivi del germe - (pagine 347 - 352).

12) Determinazione delle cellule del germe. Uova a regolazione e uova a mosaico. Centri organizzatori di Spemann - (pagine 353 - 375).

13) Differenziazione istologica - (pag. 376 - 383).

14) Organogenesi. Rapporto tra struttura e funzione - (pagine 383 - 391).

15) Accrescimento organico. Leggi e modalità di accrescimento della cellula, dei tessuti, degli organi e delle popolazioni - (pag. 392 - 411).

16) Senescenza. Durata della vita. Rapporto tra durata della vita dell'organismo e quella delle cellule che lo costituiscono - (pag. 412 - 423).

17) Rigenerazione - (pag. 424 - 436).

18) Vario grado di individualità degli organismi. Rapporti fra le cellule di uno stesso organismo. Correlazioni fra organi e tessuti - (pag. 437 - 447).

19) La riproduzione nei metazoi. Riproduzione vegetativa e sessuale. Metagenesi ed eterogonia - (pag. 448 - 460).

20) Origine e determinazione del sesso. Determinazione sperimentale del sesso. Ermafrodismo - (pag. 461 - 477).

21) L'eredità. Variabilità fluttuante. Linee pure. Mutazioni - (pag. 478 - 494).

22) L'eredità mendeleiana. Leggi. Teoria cromosomica dell'eredità mendeleiana - (pag. 495 - 529).

23) Ulteriore sviluppo del mendelismo. Fattori accoppiati. Scambio di fattori. Eredità legata al sesso. Correlazione tra i fattori. Polimeria. Fattori letali - (pag. 530 - 564).

24) Eredità nell'uomo. Eugenica - (pag. 565 - 576).

25) Rapporti vicendevoli fra gli organismi. Varie forme di simbiosi. Parassitismo - (pag. 577 - 605).

26) Classificazione degli esseri viventi. Concetto di specie. Omologia e analogia. Piani fondamentali di architettura degli animali - (pag. 606 - 630).

27) Cenni di sistematica degli animali - (pag. 631 - 729).

28) Teorie dell'evoluzione. Darwinismo. Lamarkismo. Ereditarietà dei caratteri acquisiti.

60. — Nozioni elementari sull'eredità (con 45 fig.) (Ed. « Minerva Medica », 1932).

Sono trattati in forma elementare gli argomenti concernenti l'eredità svolti nel corso di Biologia generale: Studio della variabilità - Proprietà generali dei cromosomi - Maturazione degli elementi sessuali e fecondazione, soltanto in quei particolari che hanno interesse per lo studio dell'eredità - Leggi di Mendel - Teoria cromosomica dell'eredità mendeleiana - Ulteriore sviluppo e generalizzazione dell'eredità mendeleiana - Eredità nell'uomo.

L'A. ha corredato il testo di numerosi schemi e figure tolti da vari trattati, per rendere meglio intelligibili gli argomenti svolti. L'A. si è prefisso soltanto di dare a studenti e medici un concetto chiaro e schematico del meccanismo dell'eredità mendeleiana, del valore di previsione che hanno le leggi di Mendel e dell'importanza e diffusione che ha il fenomeno della variabilità.